

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS TOSIN

**POLISSACARÍDEOS DA GOMA DE EXSUDATO E DA POLPA DOS
FRUTOS DE *Prunus persica*: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
ANÁLISES REOLÓGICAS**

**CURITIBA
2008**

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS TOSIN

**POLISSACARÍDEOS DA GOMA DE EXSUDATO E DA POLPA DOS
FRUTOS DE *Prunus persica*: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
ANÁLISES REOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica.

**Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini
Co-orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin**

**CURITIBA
2008**

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

Colaboradoras: Prof^a. Dr^a. Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz

Prof^a. Dr^a. Joana Lea Meira Silveira

Ao Moacir, meu marido, meu companheiro. Por todo amor, carinho e compreensão.
À minha mãe, Sandra, meu maior exemplo de força e perseverança, obrigada pelo amor e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai, pela graça da vida, por ser luz nos meus caminhos, força nos momentos difíceis e por ter me escolhido e permitido que eu chegasse até aqui.

Ao Prof. Marcello Iacomini, com quem eu tive o privilégio de compartilhar toda a minha caminhada acadêmica. Obrigada pela orientação, pela confiança, pelos estímulos e pelo carinho e amizade sincera que conseguimos conquistar neste período.

Ao Prof. Philip A. J. Gorin, grande cientista que, com seu exemplo, me ensinou muitas coisas sobre ciência e sobre a vida. Obrigada pela orientação e pelo seu entusiasmo em compartilhar comigo as intrigantes estruturas das gomas.

À Prof^a. Carmem Lucia de Oliveira Petkowicz, pela colaboração e supervisão nos experimentos de reologia, pelos ensinamentos, estímulos e discussões. Agradeço também pelas correções do meu projeto e relatórios e pela sua avaliação na banca interna desta tese.

À Prof^a. Joana Lea Meira Silveira pela colaboração e supervisão nos experimentos de reologia e pelas conversas, conselhos e momentos alegres que compartilhamos.

À Prof^a. Juliana Bello Baron Maurer, pela correção criteriosa desta tese na banca interna. Agradeço também pela amizade e por tudo o que eu aprendi com você, afinal, são 10 anos de convivência!

Ao meu marido, Moacir, pela compreensão, amor, amizade e dedicação. Agradeço pelo companheirismo e pelos sonhos e ideais que compartilhamos. Amo você!!!

À minha mãe, Sandra, que compartilhou, vibrou e comemorou comigo todas as minhas vitórias. Pelo exemplo, pelos momentos difíceis que superamos juntas, pelos conselhos, pelo carinho, pelo apoio e pelo amor incondicional que sempre me dedicou. Certamente, esta conquista também é sua, amo você!

Ao meu pai, que, mesmo distante, me apoiou e certamente vai se orgulhar de ter uma filha “doutora”.

Às minhas irmãs Flávia e Renata, minhas amigas e confidentes. Sei o quanto torceram por mim e o quanto devem estar alegres com esta conquista. Obrigada pelo amor e carinho, amo vocês!

À minha avó, Maria, aquela que me dá um colinho para satisfazer minhas carências. Obrigada pelo amor e pelo aconchego que sempre encontro em você.

Ao meu tio Fernando, pelo incentivo, apoio e conversas sobre a Biologia.

À Roseli e à Mauren pelo incentivo e apoio. À Júlia e ao Bruno, por existirem e fazerem a minha vida ficar mais alegre e divertida.

Às minhas queridas e verdadeiras amigas Mariana, Ana Paula, Luciana e Carolina. Obrigada pelo convívio e amizade sincera, pelos encontros (ultimamente raros) que me faziam rir e lembrar o quanto posso contar com vocês.

Ao amigo Ricardo Key, pela amizade que cultivamos desde a graduação.

Ao meu querido amigo Ricardo Wagner, meu padrinho, com quem eu aprendi muito, compartilhei o desafio da descoberta das estruturas das gomas, discutimos muitos resultados, mas o que valeu mesmo foi ter convivido com ele e conquistado a nossa amizade.

Às amigas Juliana, Rosiane, Ana Helena, Caroline, Elaine e Luciana, por toda ajuda, pela amizade, pelos conselhos, pelos “ombros”, pelas risadas, pelos estímulos, pelas caronas, enfim, por tudo o que compartilhamos durante este período. Desejo o melhor para vocês e, mesmo que nossos caminhos se distanciem, espero que nossa amizade possa ser cultivada.

Ao Thales, sempre preocupado com o bem estar das pessoas, dedicado e prestativo. É bom encontrar uma pessoa tão metódica quanto eu (ou talvez mais do que eu...) para compartilhar certas opiniões.

Ao Adriano, por sua alegria e maneira de encarar as coisas. Você faz muita falta por aqui, foi muito bom compartilhar com você esta etapa.

À Ruth, aluna de iniciação científica, que aceitou o desafio de estudar as gomas junto comigo. Obrigada pelo apoio e auxílio neste último ano.

Aos amigos do laboratório Lucimara, Rodrigo Reis, Rodrigo Vassoler, Lauro, Guilherme, Andrea, Dirce e Fhernanda, pela convivência agradável, pelo carinho e pelo apoio.

Aos amigos Diogo, Alexandre, Alan, Marco, Mariana (Nana) e João, pelo incentivo, carinho, momentos de descontração e conversas, especialmente no caminho para o “RU”.

Ao Prof. Guilherme Sasaki, Prof. Miguel Daniel Nosedá e Elaine R. Carbonero pelo auxílio e disponibilidade em realizar as análises de RMN.

À Rosane e à Andréia pelas análises de GC, GC-MS e HPSEC-MALLS.

Ao Lauro e ao Alan pelas análises de ESI-MS.

À amiga Mariana S. Araújo Pereira, ao técnico agrícola Antonio Bonkerner (IAPAR-Palmas), à FRUTALAPA Agrocomercial Ltda. (Lapa-PR) e ao Eloy Marcelo Reynand dos Santos (IAPAR-Lapa) pela coleta das gomas utilizadas neste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, representada pela Prof^a. Leda Satie Chubatsu e a todos os professores do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo estímulo.

À Dona Marilza Lamour, secretária do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, pelos auxílios prestados.

À todos que, de uma forma ou de outra, foram importantes para a realização desta tese e para meu amadurecimento científico, o meu muito obrigada!

À CAPES, ao PRONEX-Carboidratos, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende da nossa vontade e perseverança.

Albert Einstein

RESUMO

O pessegueiro (*Prunus persica*) é uma espécie altamente cultivada no sul do Brasil e produz gomas de exsudatos no seu tronco e nos frutos em condições de injúria mecânica e invasão de microrganismos elicitores. O polissacarídeo da goma do tronco (PPNA) e da goma do fruto (PPNF) apresentaram-se homogêneos quando analisados por HPSEC-MALLS, com M_w de $5,61 \times 10^6$ e $6,43 \times 10^6$ g.mol⁻¹, respectivamente. PPNA e PPNF são compostos por arabinose, xilose, manose, galactose e ácido glucurônico (e seu derivado 4-O-metil) na proporção molar de 36:7:2:42:13 e 32:13:2:33:20, respectivamente. A análise de metilação do PPNA mostrou terminais não redutores de Araf (20%) e Xylp (13%), unidades de Araf 3-O-substituídas (6%) e Arap 4-O-substituídas e/ou Araf 5-O-substituídas (14%). As unidades de galactose encontravam-se principalmente na forma 3,6-di-O- (19%) e 3,4,6-tri-O-substituídas (14%). O espectro de RMN-¹³C do PPNA mostrou, na região anomérica, 5 sinais em δ 107,5-109,5 provenientes das unidades de α -L-Araf e um sinal principal em δ 103,2 referente às unidades de β -D-Galp units. Com o intuito de elucidar a estrutura da cadeia principal do PPNA, este foi submetido à degradação controlada de Smith, gerando o polissacarídeo PPNAS. Uma estrutura mais representativa da cadeia principal do PPNA foi obtida após hidrólise ácida parcial do PPNAS (TFA 0,1M, 100 °C, 60 min), gerando o polissacarídeo PPNAS60, que apresentou galactose como principal componente monossacarídico (85%). A análise de metilação do PPNAS60 mostrou unidades de galactose como terminais não redutores (18%) e 3-O- (15%), 6-O- (45%) e 3,6-di-O-substituídas (9%), indicando a presença majoritária de ligações do tipo (1→6) na cadeia principal. Duas degradações controladas de Smith sequenciais no PPNA deram origem ao polissacarídeo PPNAS2 (0,45% de rendimento), composto por manose (29%) e galactose (71%). A análise de metilação do PPNAS2 mostrou unidades de galactose (1→3) ligadas (32%) com algumas substituições em O-2 (21%) por cadeias de manose (1→3) ligadas (17%). Estes dados indicam que as ligações (1→3) e (1→6) não ocorrem de maneira alternada no PPNA. Os oligossacarídeos β -D-GlcpA-(1→6)-D-Gal, β -D-4-Me-GlcpA-(1→6)-D-Gal e β -D-GlcpA-(1→2)-D-Man foram produzidos após hidrólise ácida parcial do PPNA. O polissacarídeo presente na goma de exsudato produzida pelo tronco da nectarineira (*Prunus persica* var. *nucipersica*) apresenta a mesma estrutura do PPNA, indicando que diferentes variedades de *Prunus persica* produzem gomas estruturalmente iguais. O polissacarídeo PPNF (goma do fruto), após análises de metilação e RMN, incluindo ¹³C, HMQC e TOCSY, mostrou alta similaridade estrutural com o PPNA, com pequenas diferenças quantitativas. Análises dos polissacarídeos presentes na polpa do pêssego apóiam a hipótese de que a goma do fruto se encontra pré-formada na polpa. Arabinogalactanas do tipo II com estruturas semelhantes ao PPNF foram encontradas na polpa. A goma de exsudato produzida pelo tronco do pessegueiro formou soluções altamente viscosas em água, desta forma, análises reológicas foram realizadas. O extrato aquoso da goma (EA) apresentou alta viscosidade intrínseca (1,95 dl.g⁻¹), comportamento não-newtoniano pseudoplástico (2, 3, 4 e 5 % m/v) e formou géis verdadeiros e termoestáveis em concentrações ≥ 3 % (m/v). Estes dados sugerem um potencial de aplicação industrial para a goma do pessegueiro.

Palavras-chave: *Prunus persica*, polissacarídeos, gomas de exsudatos, reologia

ABSTRACT

The peach tree (*Prunus persica*) is a widely disseminated species throughout the south of Brazil and produces a gum exudate on its trunk and fruit, following mechanical injury or infection by microorganisms. The polysaccharides from the trunk (PPNA) and fruit (PPNF) gum exudates were homogeneous on HPSEC-MALLS with M_w $5,61 \times 10^6$ and $6,43 \times 10^6$ g.mol⁻¹, respectively, and were composed of arabinose, xylose, mannose, galactose and glucuronic acid (and its 4-O-methyl derivative) in 36:7:2:42:13 and 32:13:2:33:20 molar ratios, respectively. Methylation analysis of PPNA showed mainly nonreducing end (20%) and 3-O-substituted Araf (6%), 4-O-substituted Arap and/or 5-O-substituted Araf (14%), and nonreducing end-units of Xylp (13%). The core Galp units were mainly 3,6-di-O- (19%) and 3,4,6-tri-O-substituted (14%). The ¹³C-NMR spectrum of PPNA agreed with this structural complexity, with 5 signals at δ 107.5-109.5 from C-1 of α -L-Araf units and a main signal at δ 103.2 from C-1 of β -D-Galp units. In order to elucidate the structure of the PPNA main-chain, it was submitted to a controlled Smith degradation, yielding PPNAS. A representative structure of PPNA was obtained by partial acid hydrolysis of PPNAS (TFA 0.1 M, 100 °C, 60 min), giving PPNAS60 polysaccharide, which had galactose as its principal monosaccharide (85%). Methylation analysis of PPNAS60 showed nonreducing end- (18%), 3-O- (15%), 6-O- (45%), and 3,6-di-O-substituted (9%) Galp units. After two successive controlled Smith degradation of PPNA, polysaccharide PPNAS2 (0.45% yield) was obtained, with 3-O-substituted Manp and Galp units, indicating that alternate (1→3) and (1→6) alternate linkages do not occur in PPNA. Oligosaccharides β -D-GlcpA-(1→6)-D-Gal, β -4-Me-D-GlcpA-(1→6)-D-Gal, and β -D-GlcpA-(1→2)-D-Man were produced on partial acid hydrolysis of PPNA. The polysaccharide from the trunk gum exudate from the nectarine tree (*Prunus persica* var. *nucipersica*), a hybrid of peach and plum, was also analyzed and was found to have the same structure as that of the polysaccharide from the trunk gum exudate from peach tree (PPNA). On methylation and NMR analyses, including ¹³C, HMQC, and TOCSY, the fruit gum polysaccharide (PPNF) showed a considerable structural similarity to PPNA, with few quantitative differences. Analysis of polysaccharides from the peach pulp supports the hypothesis that the fruit gum exudate was pre-formed in the pulp. Type II arabinogalactans with structures related to that of PPNF were characterized in the peach pulp. The trunk gum exudate from peach tree formed highly viscous aqueous solutions, stimulating interest in its rheological properties. The aqueous extract of the gum (EA) had a high intrinsic viscosity ($[\eta]$) of 1.95 dl.g⁻¹, pseudoplastic non-Newtonian behavior (at 2, 3, 4 and 5% w/v), and formed real and thermally stable gels at ≥ 3 % (w/v) concentration. These data suggest a potential industrial application for peach gum exudate.

Key-words: *Prunus persica*, polysaccharide, gum exudate, rheology

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO HEPTASSACARÍDEO ISOLADO DA GOMA ARÁBICA.....	29
FIGURA 2 -	ESTRUTURA DO POLISSACARÍDEO PRESENTE NA GOMA DE ANGICO BRANCO.....	30
FIGURA 3 -	ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA GLUCURONOMANANA PRESENTE NA GOMA DE <i>Vochysia lehmannii</i> (QUARUBA).....	33
FIGURA 4 -	OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE PARCIAL DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DO PESSEGUEIRO.....	37
FIGURA 5 -	MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA TIPO I.....	39
FIGURA 6 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO FLUXO ENTRE DUAS PLACAS PARALELAS.....	42
FIGURA 7 -	GOMAS DO TRONCO (A) E DOS FRUTOS (B) DO PESSEGUEIRO E DO TRONCO DA NECTARINEIRA (C).....	52
FIGURA 8 -	METODOLOGIA UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS E POLISSACARÍDEOS NATIVOS EXTRAÍDOS COM ÁLCALI DAS GOMAS DE EXSUDATOS DO PESSEGUEIRO E DA NECTARINEIRA.....	54
FIGURA 9 -	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA NA CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA FINA DO POLISSACARÍDEO NATIVO DA GOMA DO TRONCO DO PESSEGUEIRO (PPNA).....	56
FIGURA 10 -	METODOLOGIA UTILIZADA PARA OBTER OS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA POLPA DO PÊSSEGO ...	59
FIGURA 11 -	METODOLOGIA UTILIZADA NO FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA POLPA DO PÊSSEGO....	62
FIGURA 12 -	MÉTODO DE FRACIONAMENTO DA GOMA DO PESSEGUEIRO PARA REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES REOLÓGICAS.....	69

FIGURA 13 -	ASPECTO VISUAL DAS FRAÇÕES EA, GR E POLI SOLUBILIZADAS EM ÁGUA A 4 % (m/v).....	69
FIGURA 14 -	REGIÕES DE CARBONO ANOMÉRICO (C-1) DOS ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DOS POLISSACARÍDEOS PPN, PPNA, PPNF E PPNFA.....	74
FIGURA 15 -	PERFIS DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES PPNA E PPNF POR HPSEC-MALLS UTILIZANDO OS DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (VERMELHO) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (AZUL).....	75
FIGURA 16 -	ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DAS FRAÇÕES PPNA (A) E PPNF (B). EM DETALHE, REGIÕES DE -CH ₂ DOS ESPECTROS DE ¹³ C-DEPT.....	79
FIGURA 17 -	ESPECTROS DE HMQC DAS FRAÇÕES PPNA (A) E PPNF (B).	80
FIGURA 18 -	REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HMQC ACOPLADO DO PPNA.....	81
FIGURA 19 -	CORRELAÇÕES DE H-1 NOS ESPECTROS DE TOCSY DAS FRAÇÕES PPNA (A) E PPNF (B).....	82
FIGURA 20 -	PERFIL DE ELUIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS PPNA, PPNAS, PPNAS45 E PPNAS60 POR HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	83
FIGURA 21 -	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DO POLISSACARÍDEO DEGRADADO PPNAS. NO DETALHE: SINAIS INVERTIDOS NO ESPECTRO DE ¹³ C-DEPT.....	86
FIGURA 22 -	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DO POLISSACARÍDEO PPNAS2.....	87
FIGURA 23 -	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DO POLISSACARÍDEO PPNAS60. NO DETALHE: SINAIS INVERTIDOS NO ESPECTRO DE ¹³ C-DEPT.....	89
FIGURA 24 -	ESI-MS (MODO NEGATIVO) DOS OLIGOSSACARÍDEOS OLIGO-0,3, OLIGO-0,34 E OLIGO-0,37.....	92

FIGURA 25 -	ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DOS OLIGOSSACARÍDEOS OLIGO-0,3 (A) E OLIGO-0,37 (B). * SINAL INVERTIDO NO ESPECTRO DE ¹³ C-DEPT.....	93
FIGURA 26 -	PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO PPNEC POR HPSEC-MALLS UTILIZANDO OS DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (VERMELHO) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (AZUL).....	94
FIGURA 27 -	ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DOS POLISSACARÍDEOS PPNA (A) E PPNEC (B). NO DETALHE: SINAIS INVERTIDOS NO ESPECTRO DE ¹³ C-DEPT.....	97
FIGURA 28 -	PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO EAF POR HPSEC-MALLS UTILIZANDO OS DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (VERMELHO) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (AZUL).....	98
FIGURA 29 -	ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF (A) E EAF-SG (B). NOS DETALHES: REGIÕES DE -COOH (ESQUERDA) E DE -CH ₃	100
FIGURA 30 -	PERFIS DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES EAF-SG, EAF-SF E EAF-SFH ₂ O POR HPSEC UTILIZANDO O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	103
FIGURA 31 -	ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-SF (A) E EAF-SFH ₂ O (B). NOS DETALHES: REGIÃO DE -CH ₃ . * SINAIS INVERTIDOS NO ESPECTRO DE ¹³ C-DEPT	105
FIGURA 32 -	ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-SFH ₂ O (A) E PPNF (B). DETALHE: REGIÃO DE -CH ₃	107
FIGURA 33 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE INTRÍNSECA [η] DO EXTRATO AQUOSO (EA) DA GOMA DO PESSEGUEIRO.....	109
FIGURA 34 -	CURVAS DE VISCOSIDADE DAS FRAÇÕES EA, GR E POLI SOLUBILIZADAS EM ÁGUA (4 % m/v).....	110
FIGURA 35 -	CURVAS DE VISCOSIDADE DA FRAÇÃO EA SOLUBILIZADA EM ÁGUA NAS CONCENTRAÇÕES 1, 2, 3, 4 E 5 % (m/v).....	111
FIGURA 36 -	VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DAS FRAÇÕES GR, EA E POLI (4 % m/v) SOLUBILIZADAS EM ÁGUA.....	114

FIGURA 37 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DA FRAÇÃO EA SOLUBILIZADA EM ÁGUA NAS CONCENTRAÇÕES 2, 3, 4 E 5 % (m/v).....	115
FIGURA 38 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DA FRAÇÃO EA SOLUBILIZADA EM ÁGUA E EM NaCl 0,1M (A), CaCl ₂ 0,1M (B) E KCl 0,1M e 0,5M (C) NA CONCENTRAÇÃO 4 % (m/v).....	117
FIGURA 39 - RAMPAS DE TEMPERATURA (5-95°C / 95-5°C – FREQUÊNCIA 1 Hz) DAS FRAÇÕES GR, EA E POLI SOLUBILIZADAS EM ÁGUA NA CONCENTRAÇÃO 4 % (m/v).....	119
FIGURA 40 - RAMPA DE TEMPERATURA (5-95°C / 95-5°C – FREQUÊNCIA 1 Hz) DA FRAÇÃO EA SOLUBILIZADA EM NaCl 0,1M NA CONCENTRAÇÃO 4 % (m/v).....	120

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E REOLÓGICAS DE GOMAS DE EXSUDATOS DESCRITAS NA LITERATURA.....	49
TABELA 2 -	ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS (PPN, PPNA, PPNF E PPNFA) E DO POLISSACARÍDEO CARBOXI-REDUZIDO PPNA-CR.....	73
TABELA 3 -	ANÁLISE DE METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS PPNA E PPNF.....	77
TABELA 4 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES PPNA, PPNAS, PPNA-O, PPNAS45, PPNAS60 E PPNAS2.....	84
TABELA 5 -	ANÁLISE DE METILAÇÃO COMPARATIVA DAS FRAÇÕES PPNA, PPNAS, PPNA-O, PPNAS45, PPNAS60 E PPNAS2.....	85
TABELA 6 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES PPNA, PPNA-O, PPNEC E PPNEC-O.....	95
TABELA 7 -	ANÁLISE DE METILAÇÃO COMPARATIVA DAS FRAÇÕES PPNA, PPNA-O, PPNEC E PPNEC-O.....	96
TABELA 8 -	ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E TEOR DE PROTEÍNAS DA FRAÇÃO EAF.....	99
TABELA 9 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA POLPA DO PÊSSEGO (EAF, EAF-STCA, EAF-SG, EAF-SF E EAF-SH ₂ O) EM COMPARAÇÃO COM O POLISSACARÍDEO PPNF.....	102
TABELA 10 -	ANÁLISE DE METILAÇÃO COMPARATIVA DAS FRAÇÕES EAF-SF, EAF-SFH ₂ O E PPNF.....	104
TABELA 11 -	VARIAÇÃO DA VISCOSIDADE APARENTE DAS FRAÇÕES EA, POLI E GR (4 % m/v) EM DIFERENTES TAXAS DE CISALHAMENTO.....	110
TABELA 12 -	VARIAÇÃO DA VISCOSIDADE APARENTE DA FRAÇÃO EA (4 % m/v) EM ÁGUA E DIFERENTES SOLUÇÕES SALINAS A UMA TAXA DE CISALHAMENTO DE 10 s ⁻¹	112

TABELA 13 -	VARIAÇÃO DO MÓDULO ELÁSTICO (G') DAS FRAÇÕES GR, EA E POLI (4 % m/v) EM DIFERENTES FREQUÊNCIAS...	114
TABELA 14 -	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO NOS VALORES DE G' (MÓDULO ELÁSTICO) E G'' (MÓDULO VISCOSO) DA FRAÇÃO EA NAS FREQUÊNCIAS DE 0,1 E 1 Hz.....	116
TABELA 15 -	EFEITO DA ADIÇÃO DE SAIS NOS VALORES DE G' E G'/G'' DA FRAÇÃO EA (4 % m/v) NAS FREQUÊNCIAS DE 0,1 E 1 Hz.....	118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

δ	- deslocamento químico
τ	- tensão de cisalhamento
$\dot{\gamma}$	- taxa de cisalhamento
γ	- deformação
η	- viscosidade
η_{red}	- viscosidade reduzida
η_{sp}	- viscosidade específica
$^{13}\text{C-DEPT}$	- Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
CNTG	- goma de exsudato do cajueiro
COSY	- Correlation NMR Spectroscopy
D_2O	- água deuterada
dn/dc	- variação do índice de refração em relação à concentração
EA	- extrato obtido após extração aquosa da goma produzida pelo tronco do pessegueiro
EAF	- extrato aquoso da polpa do pêssego
EAF-PF	- fração precipitada obtida após tratamento de EAF-SG com solução de Fehling
EAF-PG	- fração insolúvel em água fria obtida após gelo e degelo de EAF
EAF-PTCA	- fração precipitada obtida após tratamento de EAF com TCA 5% (v/v)
EAF-SF	- fração solúvel obtida após tratamento de EAF-SG com solução de Fehling
EAF-SFH ₂ O	- fração de EAF-SF eluída com água da coluna de troca aniônica
EAF-SF03	- fração de EAF-SF eluída com NaCl 0,3M da coluna de troca aniônica
EAF-SF05	- fração de EAF-SF eluída com NaCl 0,5M da coluna de troca aniônica
EAF-SF1	- fração de EAF-SF eluída com NaCl 1M da coluna de troca aniônica

EAF-SF2	- fração de EAF-SF eluída com NaCl 2M da coluna de troca aniônica
EAF-SF3	- fração de EAF-SF eluída com NaCl 3M da coluna de troca aniônica
EAF-SF4	- fração de EAF-SF eluída com NaCl 4M da coluna de troca aniônica
EAF-SG	- fração solúvel em água fria obtida após gelo e degelo de EAF
EAF-STCA	- fração solúvel obtida após tratamento de EAF com TCA 5% (v/v)
EAQ	- extrato aquoso a quente da polpa do pêssego
ESI-MS	- electrospray-ionisation mass spectrometry
G'	- módulo de cisalhamento dinâmico elástico
G''	- módulo de cisalhamento dinâmico viscoso
g%	- gramas em 100 ml
GA	- goma arábica
GC-MS	- cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GLC	- cromatografia líquido-gasosa
GR	- gel (resíduo) retido em tecido fino após filtração da dispersão aquosa da goma do tronco do pessegueiro
HMQC	- Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
HOAc	- ácido acético
HPSEC-MALLS	- cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada à detectores de índice de refração e espalhamento de luz
MES	- ácido etanosulfônico-2-[N-morfolina]
ME ₂ SO	- dimetilsulfóxido
ME ₂ SO- <i>d</i> 6	- dimetilsulfóxido deuterado
m/m	- relação entre massa e massa
m/v	- relação entre massa e volume
<i>m/z</i>	- relação entre massa e carga
<i>M_w</i>	- massa molar média ponderal em massa
NaBH ₄	- boroidreto de sódio
NaB ² H ₄	- boroidreto de sódio deuterado
NaIO ₄	- periodato de sódio
NaN ₃	- azida de sódio

NaNO ₂	- nitrito de sódio
oligo-0,3	- oligossacarídeo com R _{LACT} 0,3
oligo-0,34	- oligossacarídeo com R _{LACT} 0,34
oligo-0,37	- oligossacarídeo com R _{LACT} 0,37
POLI	- igual ao PPN - Polissacarídeo obtido por precipitação etanólica do extrato aquoso (EA) da goma do tronco do pessegueiro
PPN	- polissacarídeo nativo da goma do tronco do pessegueiro extraído com água
PPNA	- polissacarídeo nativo da goma do tronco do pessegueiro extraído com álcali
PPNA-CR	- PPNA carboxi-reduzido
PPNA-O	- poliálcool obtido após oxidação do PPNA com periodato de sódio
PPNAS	- PPNA após 1 ciclo de degradação controlada de Smith
PPNAS2	- PPNA após 2 ciclos de degradação controlada de Smith
PPNAS45	- PPNAS após 45 minutos de hidrólise ácida parcial
PPNAS60	- PPNAS após 60 minutos de hidrólise ácida parcial
PPNEC	- polissacarídeo nativo da goma do tronco da nectarineira extraído com água
PPNECA	- polissacarídeo nativo da goma do tronco da nectarineira extraído com álcali
PPNEC-O	- poliálcool obtido após oxidação de PPNEC com periodato de sódio
PPNF	- polissacarídeo nativo da goma do fruto extraído com água
PPNFA	- polissacarídeo nativo da goma do fruto extraído com álcali
RMN- ¹³ C	- ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN- ¹ H	- ressonância magnética nuclear de próton
rpm	- rotações por minuto
TCA	- ácido tricloroacético
TFA	- ácido trifluoracético
TOCSY	- Total Correlation NMR Spectroscopy
TRIS	- Tris-(aminometilidenotrimetanol)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 JUSTIFICATIVA	24
1.2 OBJETIVOS GERAIS	24
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS GOMAS	27
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS GOMAS DE EXSUDATOS	27
2.3 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE GOMAS DE EXSUDATOS	28
2.3.1 Arabinogalactanas substituídas	28
2.3.2 Glucuronomananas	32
2.3.3 Glicanoramnogalacturonanas	33
2.3.4 Xilanas altamente substituídas	34
2.4 GOMAS DE EXSUDATOS DO GÊNERO <i>Prunus</i>	34
2.5 POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR	38
2.5.1 Pectinas	38
2.5.2 Arabinogalactanas	40
2.6 REOLOGIA	41
2.6.1 Análises reológicas de gomas de exsudatos	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 OBTENÇÃO DAS GOMAS DE EXSUDATOS E DOS FRUTOS	51
3.2 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS DAS GOMAS	52
3.3 DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS REALIZADAS NO POLISSACARÍDEO NATIVO OBTIDO DA GOMA DO TRONCO DO PESSEGUEIRO (PPNA)	55
3.3.1 Oxidação com periodato de sódio e degradação controlada de Smith	55
3.3.2 Hidrólise ácida parcial no polissacarídeo obtido após degradação controlada de Smith (PPNAS)	57
3.3.3 Produção de oligossacarídeos ácidos a partir de hidrólise ácida parcial	57
3.3.4 Carboxi-redução	58

3.4	OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA POLPA DO PÊSSEGO.....	58
3.4.1	Fracionamento dos polissacarídeos presentes na polpa do pêssago.....	60
3.5	ANÁLISE ESTRUTURAL DOS CARBOIDRATOS OBTIDOS.....	63
3.5.1	Análise de composição monossacarídica.....	63
3.5.2	Determinação de homogeneidade e massa molar (M_w).....	63
3.5.3	Análises de metilação.....	64
3.5.4	Métodos analíticos.....	65
3.5.4.1	Cromatografia de partição em papel.....	65
3.5.4.2	Cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS).....	65
3.5.4.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	66
3.5.4.4	“Electrospray-ionisation mass spectrometry” (ESI-MS) dos oligossacarídeos	66
3.5.5	Métodos colorimétricos.....	66
3.5.5.1	Dosagem de açúcar total.....	66
3.5.5.2	Dosagem de ácidos urônicos.....	67
3.5.5.3	Dosagem de proteínas.....	67
3.6	ANÁLISES REOLÓGICAS - GOMA DO TRONCO DO PESSEGUEIRO.....	68
3.6.1	Solubilização e fracionamento da goma.....	68
3.6.2	Análise da viscosidade intrínseca.....	70
3.6.3	Análises de comportamento de fluxo e dinâmico oscilatórias.....	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1	ANÁLISE QUÍMICA E ESTRUTURAL DAS GOMAS DO PESSEGUEIRO.....	72
4.1.1	Polissacarídeos nativos da goma do tronco (PPN e PPNA) e da goma do fruto (PPF e PPFA).....	72
4.1.2	Polissacarídeos produzidos por degradação controlada de Smith no PPNA (PPNAS e PPNAS2).....	83
4.1.3	Polissacarídeos obtidos após hidrólise ácida parcial no PPNAS (PPNAS45 e PPNAS60).....	88
4.1.4	Oligossacarídeos produzidos por hidrólise ácida parcial do PPNA.....	90
4.2	ANÁLISE ESTRUTURAL COMPARATIVA ENTRE AS GOMAS PRODUZIDAS PELOS TRONCOS DO PESSEGUEIRO E DA NECTARINEIRA.....	94

4.3 ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA POLPA DO PÊSSEGO – COMPARAÇÃO COM A GOMA DO FRUTO.....	98
4.4 ANÁLISES REOLÓGICAS DA GOMA PRODUZIDA PELO TRONCO DO PESSEGUEIRO.....	108
4.4.1 Viscosidade intrínseca da fração EA.....	108
4.4.2 Avaliação do comportamento de fluxo das frações EA, GR e POLI.....	109
4.4.3 Análises dinâmico-oscilatórias.....	113
5 CONCLUSÕES.....	121
REFERÊNCIAS.....	122
APÊNDICE.....	134

1 INTRODUÇÃO

As gomas de exsudatos vegetais são utilizadas nas indústrias alimentícias, cosméticas, farmacêuticas, entre outras, devido às suas propriedades de formarem soluções viscosas ou até mesmo géis. Sabe-se que tal característica tem relação com a estrutura química do polissacarídeo que as compõem (WHISTLER, 1993). Apesar da riqueza da flora brasileira, pouco se conhece e se investe nas gomas produzidas por ela e, desta maneira, o Brasil destina um grande aporte financeiro para a importação de gomas. A importação da goma arábica (originária do Senegal), por exemplo, custa ao Brasil cerca de \$ 1.900.000,00 por ano (BARBOSA, 2003). O cajueiro, espécie nativa brasileira amplamente cultivada na região Nordeste, produz uma goma que muito se assemelha à goma arábica, tanto na estrutura química básica quanto em suas propriedades físico-químicas, compreendendo o único exemplo de goma brasileira já utilizada como substituta da goma arábica no mercado interno (BARBOSA, 2003).

O Brasil ocupa a 13^o posição na produção mundial de pêssegos e nectarinas e esta produção é concentrada na região sul do país devido ao clima temperado necessário para o desenvolvimento dos frutos. Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), no ano de 2004, a produção brasileira de pêssegos foi de, aproximadamente, 235.720 toneladas, sendo o estado do Rio Grande do Sul responsável por 52% da produção, seguido do estado de São Paulo (20%), Santa Catarina (13%) e Paraná (10%). A produção de gomas de exsudatos no tronco e nos frutos do pessegueiro é muito comum e ocorre, normalmente, após contaminação pelo fungo *Botryosphaeria dothidea* durante o outono ou primavera (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2005). A alta produção de pêssegos na região Sul do Brasil aliada à busca por gomas naturais potencialmente úteis na indústria motivou a análise química e reológica das gomas de exsudatos produzidas pelo pessegueiro (*Prunus persica*). Os polissacarídeos presentes na polpa do pêssego e na goma produzida pela nectarineira, uma variedade do pêssego sem pêlos em sua superfície (*Prunus persica* var. *nucipersica*), também foram objetos de estudo deste trabalho.

1.1 JUSTIFICATIVA

A importância e a justificativa da realização desta pesquisa pode ser embasada nos seguintes aspectos:

- O sul do Brasil é responsável por 75% da produção nacional anual de pêssegos. Aliado a isto, o pessegueiro é altamente susceptível à produção de goma, processo este denominado “gomose”, especialmente devido ao constante processo de poda que propicia a invasão de microrganismos elicitores;
- Existe uma necessidade de se buscar gomas de espécies brasileiras potencialmente úteis na indústria para substituir as gomas importadas. Além disso, a pesquisa em gomas brasileiras apresenta uma perspectiva de sustentabilidade. Uma plantação de pessegueiros poderia gerar, além dos frutos, sub-produtos úteis e economicamente valiosos para os produtores, com um custo menor do que é destinado à importação. Aliado a isto, maior seria a demanda de mão-de-obra, gerando mais empregos;
- A caracterização química fina do polissacarídeo presente na goma é um requisito importante para as análises reológicas e futuras aplicações industriais;
- A análise estrutural comparativa dos polissacarídeos presentes na goma do tronco, na goma do fruto e na polpa do fruto (*Prunus persica*) poderá fornecer informações importantes sobre a biossíntese destas moléculas;

1.2 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais desta pesquisa foram:

- Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos presentes nas gomas de exsudatos produzidas pelo tronco e pelos frutos do pessegueiro (*Prunus persica*) e pelo tronco da nectarineira (*Prunus persica*, var. *nucipersica*);
- Analisar os polissacarídeos presentes na polpa do pêssego;
- Realizar análises reológicas na goma produzida pelo tronco do pessegueiro.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir os objetivos gerais acima descritos, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Obter os polissacarídeos nativos presentes nas gomas produzidas pelo tronco e pelo fruto do pessegueiro (*Prunus persica*) e pelo tronco da nectarineira (*Prunus persica*, var. *nucipersica*);
- A partir do polissacarídeo nativo obtido da goma do tronco do pessegueiro realizar degradação controlada de Smith, carboxi-redução e hidrólise ácida parcial;
- Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos nativos e aqueles obtidos por degradação controlada de Smith, hidrólise ácida parcial e carboxi-redução através de métodos cromatográficos, químicos e espectroscópicos;
- Purificar e caracterizar os oligossacarídeos ácidos produzidos por hidrólise ácida parcial;
- Extrair os polissacarídeos presentes na polpa do pêssego, fracioná-los, caracterizar estruturalmente a fração rica em arabinogalactanas e compará-la com a estrutura do polissacarídeo presente na goma do fruto;
- Fracionar a goma produzida pelo tronco do pessegueiro e realizar análises reológicas variando a concentração e o solvente utilizado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS GOMAS

O termo goma é utilizado, de uma maneira geral, para definir moléculas hidrofílicas ou hidrofóbicas de alta massa molar que possuem propriedades coloidais (WHISTLER, 1973). Na indústria, são chamados de goma os polissacarídeos de origem vegetal como a goma arábica, alginatos, agarose e os de origem microbiana como a xantana e succinoglicana (MOORHOUSE, 1987).

As gomas de exsudatos vegetais são aquelas substâncias de origem vegetal exsudadas através dos frutos, galhos ou troncos das árvores. Elas são produzidas espontaneamente como parte do metabolismo normal da planta ou, mais frequentemente, em resposta à injúria mecânica ou invasão microbiana. Desta forma, acredita-se que sua biossíntese esteja envolvida com algum mecanismo protetor do vegetal (JONES, J. K. N. e SMITH, F., 1949; MARQUES e XAVIER-FILHO, 1991). Além disso, a adaptação do vegetal a determinadas condições climáticas pode provocar a produção destas gomas, processo este designado "gomose fisiológica" (POSER, 2000).

Os polissacarídeos são, sem dúvida, os componentes mais abundantes nas gomas de exsudatos, entretanto, foi descrita a presença de oligossacarídeos livres redutores como componentes glicídicos minoritários (DELGOBO *et al.*, 1998; MENESTRINA *et al.*, 1998; TISCHER; GORIN; IACOMINI, 2002). Algumas gomas ainda possuem proteínas (JONES, J. K. N. e SMITH, F., 1949) e enzimas como oxidases (peroxidases e polifenoloxidasas) e quitinases, envolvidas na resposta do vegetal à infecção por patógenos (MARQUES e XAVIER-FILHO, 1991). A presença de compostos fenólicos também foi detectada, sendo estes envolvidos em mecanismos de defesa antioxidantes (JONES, J. K. N. e SMITH, F., 1949).

Dentre as gomas de exsudatos mais utilizadas na indústria estão a goma arábica, karaya, ghatti e tragacanta. Elas podem ser empregadas nas indústrias de detergentes, têxtil, de adesivos, de papel, de tintas, alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (WHISTLER, 1993; RODRIGUES; PAULA; COSTA, 1993). Nestas indústrias as gomas são utilizadas como agentes espessantes, geleificantes,

emulsificantes, floculantes, clarificantes, encapsuladores, estabilizadores de espuma e de suspensão, entre outros (BeMILLER, 1987).

Além do potencial industrial e econômico, alguns estudos sugerem que os polissacarídeos das gomas poderiam ser utilizados para fins quimiotaxonômicos devido à grande similaridade estrutural entre espécies do mesmo gênero, como é o caso do gênero *Acacia* (ANDERSON e GILL, 1975; STEPHEN, 1983), ou até mesmo dentro de uma mesma família, como é o caso das palmeiras (família Arecaceae) (MAURER-MENESTRINA *et al.*, 2003; SIMAS *et al.*, 2004 e 2006). Atividades biológicas também foram atribuídas a polissacarídeos de gomas de exsudatos. O polissacarídeo presente na goma de angico branco (*Anadenanthera colubrina*) (DELGOBO *et al.*, 1998) mostrou atividade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ativando macrófagos e aumentando tanto sua capacidade fagocítica como a produção de ânion superóxido (MORETÃO *et al.*, 2003). Esta molécula ainda apresentou atividade antitumoral contra células de Sarcoma-180 (MORETÃO *et al.*, 2004). Atividade anti-hipertensiva foi descrita para o polissacarídeo presente na goma do cajueiro (CARVALHO, 2007). Tal polissacarídeo também mostrou atividade sobre células vegetais, estimulando a embriogênese somática e a conversão de embriões em plântulas em células de cenoura (PEREIRA-NETTO *et al.*, 2007).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS GOMAS DE EXSUDATOS

As gomas de exsudatos podem ser classificadas com base tanto nas características químicas, físicas e físico-químicas como na estrutura química detalhada dos polissacarídeos que as compõem. Smith, F. e Montgomery (1959) propuseram a classificação de acordo com as propriedades físicas como viscosidade e solubilidade e com relação à presença ou ausência de ácidos urônicos. A classificação também pode ser baseada na estrutura química do polissacarídeo presente na goma. Com base neste critério, Aspinall (1969) classificou as gomas conforme a estrutura das cadeias internas dos polissacarídeos, sendo estas bastante similares às estruturas de polissacarídeos típicos de parede celular vegetal como galactanas, pectinas e hemiceluloses. Assim, as gomas do grupo das galactanas possuem cadeia principal de galactose, as do grupo das galacturonanas

apresentam cadeia principal de ácido galacturônico, as glucuronomananas possuem cadeia principal de manose e ácido glucurônico e as xilanas com cadeia principal de xilose.

Uma classificação mais completa foi proposta por Stephen (1983) onde a classificação leva em consideração não apenas na cadeia principal, mas também as cadeias laterais do polissacarídeo que compõe a goma. Com base nesta classificação as gomas podem estar incluídas no grupo das arabinogalactanas substituídas, glucuronomananas, glicanoramnogalacturonanas ou xilanas altamente substituídas. Baseando-se nesta classificação os aspectos estruturais das gomas de exsudatos descritas na literatura serão revisadas a seguir.

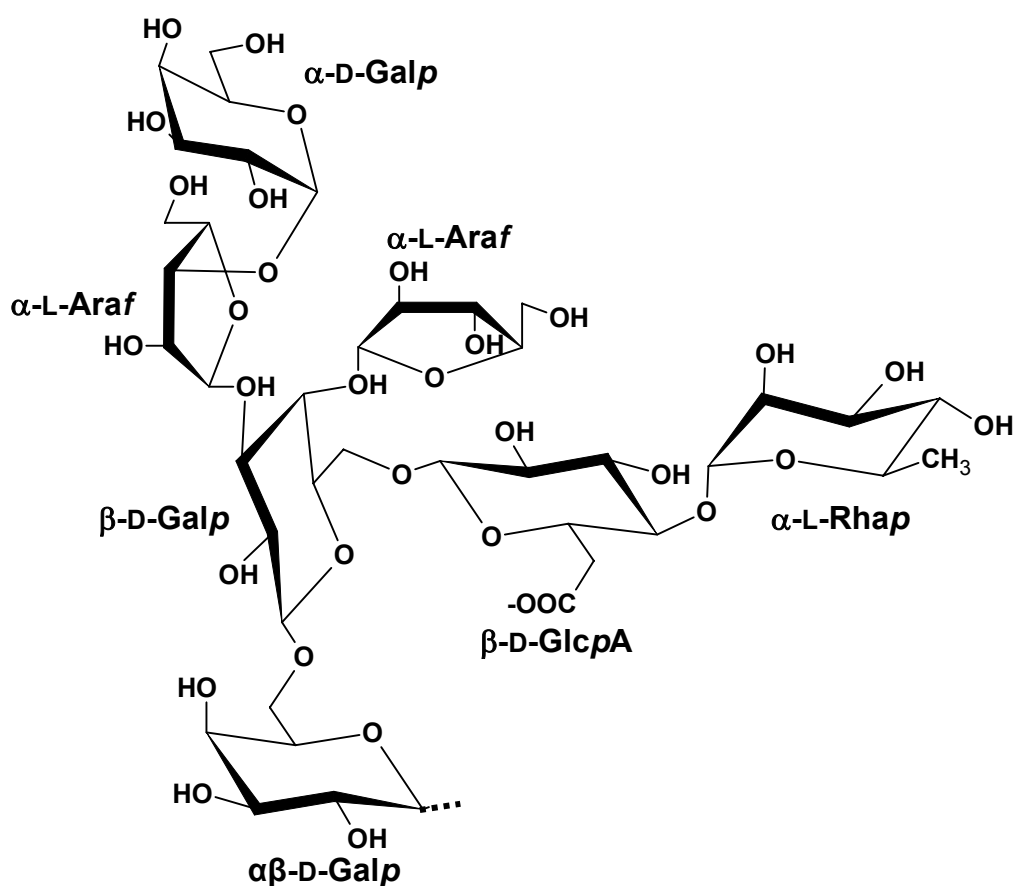
2.3 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE GOMAS DE EXSUDATOS

Dentre os polissacarídeos vegetais, os polissacarídeos das gomas englobam as estruturas mais complexas (ASPINALL, 1969), sendo esta complexidade resultado da presença de diferentes componentes monossacarídicos, anéis furanosídicos e piranosídicos, enantiômeros D e L além de diferentes tipos de ligações glicosídicas. Acredita-se que a síntese de moléculas tão complexas esteja envolvida na resistência aos sistemas enzimáticos de organismos invasores (JONES, J. K. N. e SMITH, F., 1949).

2.3.1 Arabinogalactanas substituídas

As arabinogalactanas substituídas (STEPHEN, 1983) são os polissacarídeos mais abundantes nas gomas de exsudatos já estudadas. Neste grupo está incluída a goma arábica (produzida pela espécie *Acacia senegal*) (família Mimosaceae) que é constituída por arabinose (28%), galactose (39%), ácido glucurônico (17,5%), ácido 4-O-metil-glucurônico (1,5%) e ramnose (14%), formando uma cadeia principal de β -D-galactopiranosose ligada (1 \rightarrow 3) com ligações (1 \rightarrow 6) alternadas e cadeias laterais

altamente ramificadas (SMITH, F., 1939; ANDERSON; HIRST; STODDART, 1966a, 1966b; DEFAYE e WONG, 1986). Tischer, Gorin e Iacomini (2002) caracterizaram os oligossacarídeos livres redutores presentes na goma arábica, dentre eles o heptassacarídeo composto por uma cadeia de α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Galp, sendo que a unidade de galactose intermediária está substituída em O-4 e O-6 por α -L-Araf e α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA, respectivamente (Figura 1). O estudo deste e de outros oligossacarídeos possibilitou a análise detalhada das cadeias laterais presentes no polissacarídeo da goma arábica. Estruturas similares à da goma arábica também foram encontradas em gomas de outras espécies do gênero *Acacia* (ANDERSON e GILL, 1975), sugerindo que estas moléculas podem funcionar como uma ferramenta quimiotaxonômica dentro deste gênero.



A unidade redutora representa uma unidade de galactose da cadeia principal 3-O-ligada e substituída em O-6

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO HEPTASSACARÍDEO ISOLADO DA GOMA ARÁBICA

A goma de exsudato produzida por *Anadenanthera colubrina* (angico branco – família Mimosaceae) também pertence ao grupo das arabinogalactanas substituídas e seu polissacarídeo é composto por arabinose (64%), galactose (20%), ácido urônico (10%), ramnose (6%) e manose (1%) (DELGOBO *et al.*, 1998). A estrutura química do polissacarídeo é extremamente complexa, formada por uma cadeia principal de β -D-galactopiranosose ligadas (1 \rightarrow 3), com grande variedade de cadeias laterais, que englobam unidades de α -L-Rhap, β -D-GlcpA, β -D-Galp, α -L-Araf, β -L-Araf e α -L-Arap. A caracterização química fina das cadeias laterais do polissacarídeo foi possível através do estudo detalhado dos oligossacarídeos livres redutores presentes na goma (DELGOBO *et al.*, 1999) (Figura 2).

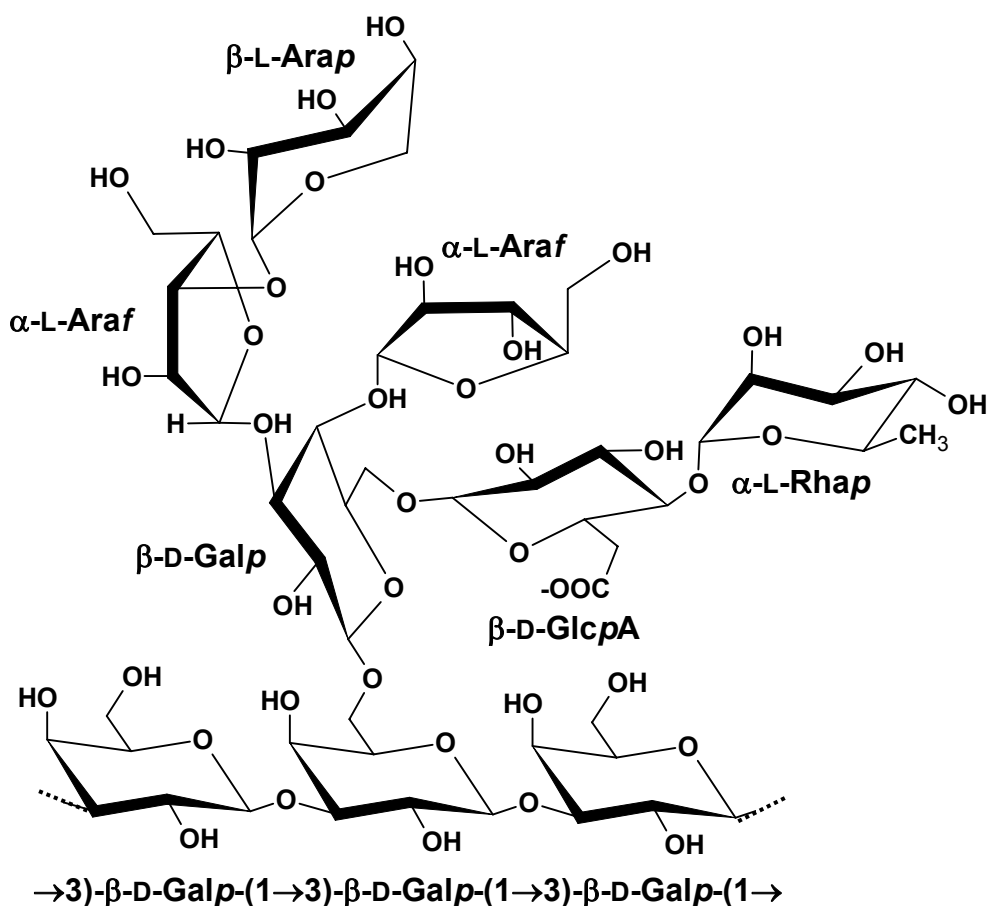


FIGURA 2 – ESTRUTURA DO POLISSACARÍDEO PRESENTE NA GOMA DE ANGICO BRANCO.

Dentro deste mesmo grupo, Menestrina *et al.* (1998) estudaram a goma produzida pelo tronco do cajueiro (*Anacardium occidentale* - família Anacardiaceae), e seu polissacarídeo mostrou-se composto por ramnose (2%), arabinose (4%), xilose (1%), galactose (82%), glucose (6%) e ácido glucurônico (5%). A cadeia principal possui unidades de galactose β -(1 \rightarrow 3) ligadas e substituídas em O-6 por cadeias laterais compostas por α -L-Rhap, β -D-GlcpA, β -D-Galp e α -L-Araf. As cadeias laterais foram caracterizadas pelo estudo de oligossacarídeos naturais e daqueles produzidos por hidrólise ácida parcial.

Após injúria mecânica, o fruto de *Chorisia speciosa* (família Bombacaceae) produz uma goma composta por uma arabinogalactana substituída. Este polissacarídeo é composto por ramnose, arabinose, xilose, manose, glucose, galactose e ácido glucurônico na proporção molar de 20:11:1:3:2:40:23 apresentando estrutura similar à da goma arábica. Os polissacarídeos do fruto também foram analisados e uma arabinogalactana com estrutura altamente semelhante à encontrada na goma foi caracterizada, sugerindo que o polissacarídeo exsudado na goma já se encontra pré-formado no mesocarpo do fruto (BELESKI-CARNEIRO; GANTER; REICHER, 1999).

O polissacarídeo presente na goma do limoeiro (*Citrus limonia*) foi caracterizado como uma arabinogalactana altamente ramificada com cadeia principal de unidades de galactose β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) ligadas, dispostas de maneira não ordenada, e cadeias laterais de ramnose, ácido glucurônico e arabinose (STODDART e JONES, 1968).

O polissacarídeo neutro da goma tragacanto (*Astragalus gummiifer*) (~30% do total da goma) foi caracterizado como uma arabinogalactana substituída, com terminais não redutores de L-Araf e unidades de L-Araf mono-substituídas (5-, 3- e 2-), di-substituídas (2,5-, 3,5-) e tri-substituídas (2,3,5-). A cadeia principal é composta por unidades de Galp (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) ligadas, sendo que as ligações (1 \rightarrow 6) são mais abundantes (STEPHEN, 1983; ASPINALL e BAILLIE, 1963, TISCHER; IACOMINI; GORIN, 2002).

Dentro do grupo das arabinogalactanas substituídas, muitas outras gomas são relatadas na literatura a exemplo das gomas de *Prosopis spp.* – goma mesquita (família Fabaceae) (ASPINALL e WHITEHEAD, 1970a, 1970b), *Murraya paniculata* (família Rutaceae) (MONDAL *et al.*, 2001), *Albizia lebbbeck* (família Fabaceae)

(PAULA; SANTANA; RODRIGUES, 2001), *Enterolobium cyclocarpum* e *contortisilliquum* (família Fabaceae) (PINTO *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2001), *Meryta sinclairii* (família Araliaceae) (SIMS e FURNEAUX, 2003), de *Spondias dulcis* e *purpurea* (família Anacardiaceae) (MARTÍNEZ *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2005), entre outras.

2.3.2 Glucuronomananas

No grupo das glucuronomananas (STEPHEN, 1983) está incluída a goma ghatti (*Anogeissus latifolia*) que é composta por um heteropolissacarídeo com cadeia principal de $\rightarrow 2$)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow e cadeias laterais de L-Arap, D-Galp, L-Araf e D-GlcpA (ASPINALL, 1969; TISCHER *et al.*, 2002). Wagner *et al.* (2004) caracterizaram um polissacarídeo similar, porém menos complexo, na goma de Quaruba (*Vochysia lehmannii*), onde a análise de oligossacarídeos ácidos produzidos por hidrólise ácida parcial auxiliou na caracterização da cadeia principal alternada e repetitiva do polissacarídeo (Figura 3). Os mesmos autores (WAGNER *et al.*, 2007a, 2007b) analisaram as gomas de outras duas espécies de *Vochysia* (*tucanorum* e *thyrsoidea*) encontrando estruturas com cadeias principais iguais à encontrada para *Vochysia lehmannii* ($\rightarrow 2$)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow) porém altamente ramificadas em O-3 das unidades de Manp por cadeias laterais de Araf, Arap e Galp.

A goma produzida pelo tronco de *Chorisia speciosa*, diferente daquela produzida pelos frutos, é composta por um polissacarídeo do grupo das glucuronomananas com cadeia principal de $\rightarrow 2$)- α -Manp-(1 \rightarrow 4)- β -GlcpA-(1 \rightarrow e cadeias laterais altamente ramificadas compostas por galactose, ácido glucurônico, ramnose e arabinose (FABIO; DUTTON; MOYNA, 1982).

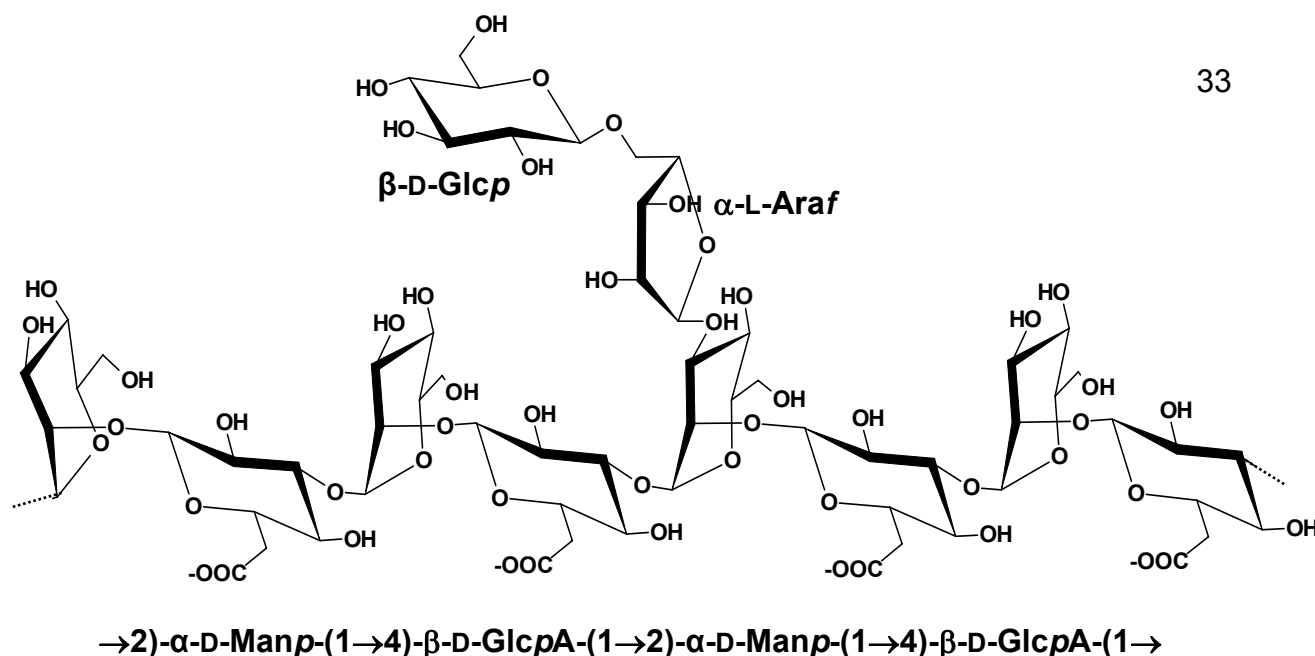


FIGURA 3 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA GLUCURONOMANANA PRESENTE NA GOMA DE *Vochysia lehmannii* (QUARUBA).

2.3.3 Glicanoramnogalacturonanas

A goma karaya, obtida de espécies do gênero *Sterculia*, especialmente *Sterculia urens*, pertence ao grupo das glicanoramnogalacturonanas (STEPHEN, 1983), que engloba polissacarídeos com cadeia principal de GalpA e Rhap. Tal goma possui um polissacarídeo naturalmente acetilado com cadeia principal composta por GalpA, Rhap e Galp. A presença de seqüências alternadas de GalpA e Rhap na cadeia principal é descrita em polissacarídeos pécticos, porém a repetição de unidades de GalpA ligadas a Gal parece ser peculiar à estrutura desta goma (STEPHEN, 1983). Outro exemplo dentro deste grupo é a goma produzida pelas folhas de *Mesona blumes* (Lamiaceae). O polissacarídeo ácido presente nesta goma possui ~90% da cadeia principal composta por unidades de α -GalpA (1 \rightarrow 4) ligadas e ~10% composta por unidades de α -Rhap (1 \rightarrow 2) ligadas. Algumas unidades de ácido galacturônico apresentam-se acetiladas e outras na forma de metil éster. Cadeias laterais de arabinogalactanas, arabinanas, galactanas e xilanas podem estar substituindo as unidades de ramnose em O-4 (TAO *et al.*, 2008).

O componente ácido da goma tragacanto, ácido tragacântico (60-70% do total da goma), apresenta cadeia principal de unidades α -GalpA (1 \rightarrow 4) ligadas com

raras inserções de Rhap. A maioria destas unidades ácidas são substituídas em O-3 por cadeias laterais compostas por xilose, fucose e galactose (ASPINALL, 1969; STEPHEN, 1983).

2.3.4 Xilanas altamente substituídas

Poucos exemplos de gomas do grupo das xilanas altamente substituídas (STEPHEN, 1983) são descritos na literatura. Os polissacarídeos que constituem estas gomas são estruturalmente relacionados com as heteroxilanas e arabinoxilanas (hemiceluloses) da parede celular vegetal os quais possuem cadeia principal de unidades de β -D-Xylp (1 \rightarrow 4) ligadas (ASPINALL, 1969). Exemplos dentro deste grupo são as gomas produzidas pelas espécies de palmeiras: *Livistona chinensis* (Leque-chinês) (MAURER-MENESTRINA *et al.*, 2003), *Syagrus romanzoffiana* (Jerivá) (SIMAS *et al.*, 2006) e *Scheelea phalerata* (Uricuri) (SIMAS *et al.*, 2004). Elas possuem polissacarídeos muito semelhantes, com cadeia principal composta por unidades β -Xylp (1 \rightarrow 4)-ligadas e altamente substituídas em O-2 e O-3 por unidades de 4-O-Me- α -D-GlcpA, α -D-GlcpA, α -L-Araf, Arap, β -D-Xylp e Fucp.

2.4 GOMAS DE EXSUDATOS DO GÊNERO *Prunus*

Espécies do gênero *Prunus* (família Rosaceae) englobam uma grande variedade de árvores frutíferas conhecidas, como o pessegueiro (*Prunus persica*), o damasqueiro (*Prunus insitia*), a ameixeira (*Prunus domestica*), a cerejeira (*Prunus cerasus* e *Prunus virginiana*) e a amendoeira (*Prunus amygdalus*). Tais espécies são grandes produtoras de gomas de exsudatos, especialmente aquelas árvores que estão em constante processo de poda em pomares, devido à injúria mecânica e seqüencial invasão de microrganismos elicitores (STEPHEN, 1983).

Alguns aspectos estruturais dos polissacarídeos presentes nestas gomas são descritos na literatura. Sabe-se, por exemplo, que eles pertencem ao grupo das arabinogalactanas substituídas, com cadeia principal composta por unidades de

galactose, sendo semelhantes à goma arábica, especialmente devido à sua composição em açúcares ácidos e neutros.

A goma produzida pelo damasqueiro (“damson gum”) (*Prunus insitia*) difere da goma arábica porque possui xilose e manose como componentes monossacarídicos e não contém unidades de ramnose. A análise conjunta dos derivados metilados obtidos do polissacarídeo nativo e daquele obtido por hidrólise ácida parcial mostra que as cadeias laterais de arabinofuranose são (1→5) ligadas e que a cadeia principal do polissacarídeo é composta de unidades de galactose com ligações (1→6) e (1→3) alternadas ou com ligações (1→6) sendo grande parte destas substituídas em O-3 por outras unidades de galactose (1→3) ligadas. Um aspecto importante é a presença do oligossacarídeo aldobiurônico GlcpA-(1→2)-Manp, que não está presente na goma arábica (HIRST e JONES, J. K. N., 1938 e 1946; JONES, J. K. N. e SMITH, 1949).

As gomas produzidas por cerejeiras (“cherry gum”) (*Prunus cerasus* e *Prunus virginiana*) possuem polissacarídeos com grande variabilidade estrutural quando se comparam as diferentes espécies e as diferentes variedades dentro de uma mesma espécie, especialmente no que diz respeito às proporções de monossacarídeos e ao modo de ligação destes na cadeia principal. De um modo geral, o polissacarídeo desta goma se assemelha àquele encontrado na goma do damasqueiro, é composto majoritariamente por arabinose e galactose e possui ainda unidades de xilose, ácido glucurônico e manose. Uma diferença observada com base nos dados de metilação é que as unidades de arabinofuranose das cadeias laterais são (1→3) ligadas, como ocorre na goma arábica (JONES, J. K. N., 1939; JONES, J. K. N. e SMITH, 1949).

O polissacarídeo presente na goma de ameixeira (“egg plum gum”) (*Prunus domestica*) é bastante semelhante ao encontrado na goma arábica, porém, como no caso das outras espécies de *Prunus* citadas, ele apresenta xilose em sua composição. Sob condições de autohidrólise, este polissacarídeo elimina as unidades de arabinose e xilose e mantém um núcleo “estável”, o qual, após hidrólise ácida, dá origem a unidades de galactose e ao ácido aldobiurônico GlcpA-(1→6)-Gal, o qual também é encontrado na goma arábica (HIRST e JONES, J. K. N., 1947 e 1948; JONES, J. K. N. e SMITH, 1949).

A primeira análise da goma do pessegueiro (“peach gum”) (*Prunus persica*) foi realizada por Jones (1950), o qual descreveu um polissacarídeo composto por GlcpA, 4-Me-GlcpA, Gal, Man, Ara e Xyl na proporção molar de 2,5:2,5:25:2:32:15, além de traços de ramnose e produziu, através de hidrólise ácida, o aldobiurônico GlcpA-(1→6)-GalA. Em 1967, os aldobiurônicos β -GlcpA-(1→6)-Gal, 4-Me- β -GlcpA-(1→6)-Gal e β -GlcpA-(1→2)-Man também foram identificados após hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo (ROSÍK; KARDOSOVÁ; KUBALA, 1967). A análise de metilação em conjunto com análise de rotação óptica específica ($[\alpha]_D +5,5^\circ$) do polissacarídeo nativo e degradado identificou a cadeia principal composta por unidades de β -D-Galp 6-O-ligadas (ROSÍK *et al.*, 1966). Os oligossacarídeos neutros obtidos por hidrólise ácida parcial ou por hidrólise enzimática foram analisados quimicamente e forneceram importantes informações sobre a estrutura do polissacarídeo. A identificação do oligossacarídeo β -D-Galp-(1→6)- β -D-Galp-(1→3)- β -D-Galp-(1→6)- α -D-Galp sugere a presença dos dois tipos de ligações na cadeia principal (KARDOSOVÁ *et al.*, 1979). Os oligossacarídeos neutros isolados e caracterizados (KUBALA e ROSÍK, 1977; KARDOSOVÁ; ROSÍK; KUBALA, 1978; KARDOSOVÁ *et al.*, 1979) foram revisados por Stephen (1983) e estão apresentados na Figura 4.

Apesar dos trabalhos encontrados na literatura sobre a goma do pessegueiro, pode-se verificar que a análise da estrutura química fina dos polissacarídeos não foi realizada, talvez por falta de recursos analíticos na época destes estudos. Atualmente, em que a química de carboidratos utiliza técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetectores (HPSEC-MALLS) e “Electrospray-ionisation mass spectrometry” (ESI-MS), técnicas estas mais avançadas e sensíveis, tais estruturas podem ser detalhadamente estudadas.

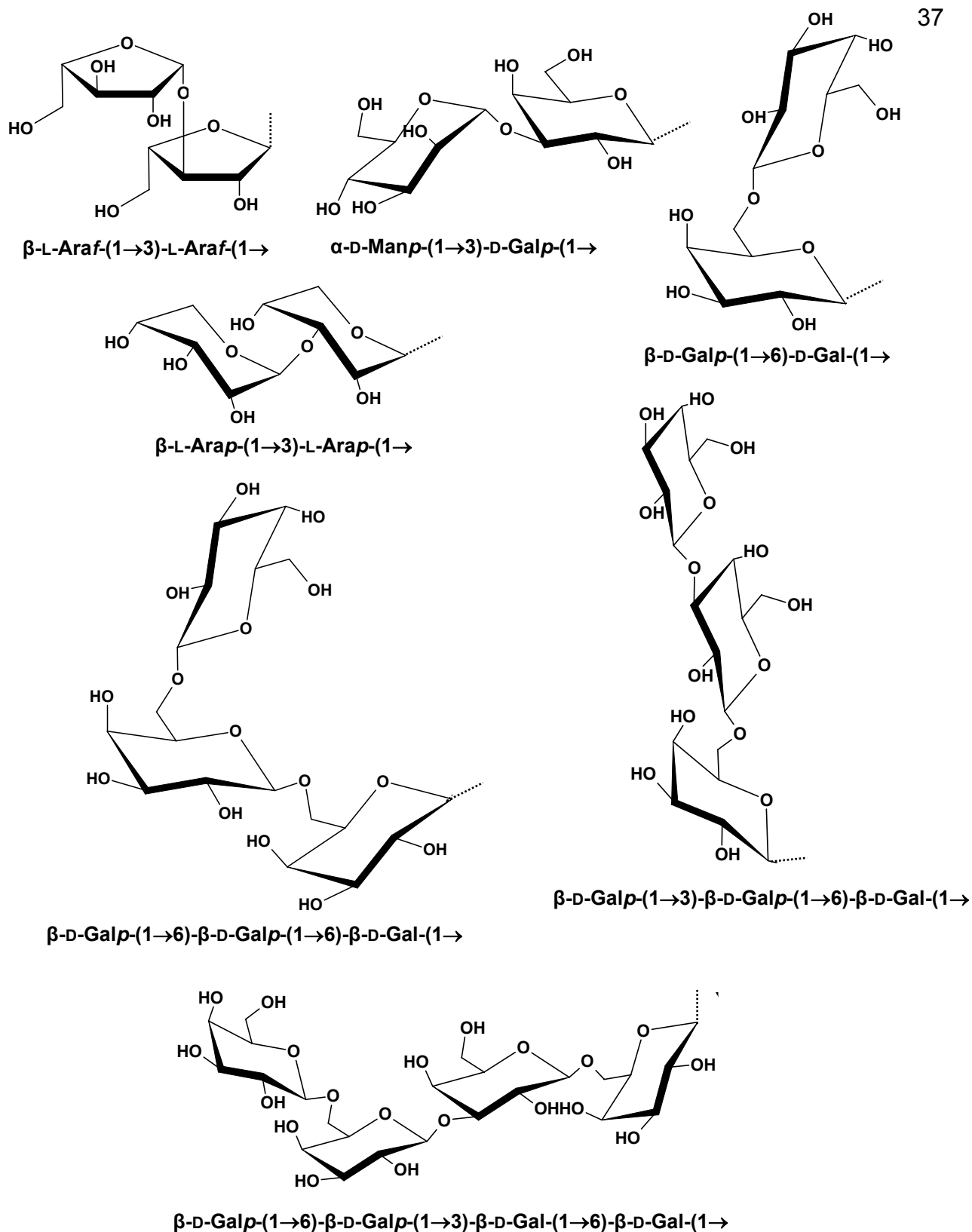


FIGURA 4 – OLIGOSSACARÍDEOS NEUTROS OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE PARCIAL DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DO PESSEGUIRO
 FONTE: Stephen (1983), adaptado pela autora

2.5 POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR

Um dos objetivos desta pesquisa foi estudar, comparativamente, o polissacarídeo da goma de exsudato produzida pelos frutos do pessegueiro e os polissacarídeos presentes na polpa do pêssgo. Desta maneira, uma breve revisão sobre os polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal, que englobam os polissacarídeos da polpa, será agora realizada.

Carpita e Gibeaut (1993) propuseram um modelo estrutural para a parede celular primária de dicotiledôneas (parede celular tipo I) (Figura 5), grupo onde está incluído o pêssgo, onde as microfibrilas de celulose estão entrelaçadas por xiloglucanas (hemicelulose) e esta estrutura está embutida numa matriz de polissacarídeos pécticos: ácido poligalacturônico e ramnogalacturonanas.

Em frutos, o amadurecimento está relacionado a mudanças na estrutura da parede celular que englobam dissolução da lamela média (interface célula-célula) e a desestruturação da parede celular primária. A solubilização dos polissacarídeos pécticos e hemicelulósicos, a ação de enzimas específicas que provocam despolimerização destes e suas novas associações levam ao processo de perda de firmeza que culminam no amadurecimento do fruto (GAULAO e OLIVEIRA, 2008).

O pêssgo apresenta mais de 50% da sua polpa composta por polissacarídeos pécticos (KURZ; CARLE; SCHIEBER, 2008) e, devido a isso, as características estruturais de pectinas serão melhor abordadas a seguir.

2.5.1 Pectinas

Pectinas são uma classe de polissacarídeos complexos caracterizados por apresentar altos teores de ácido galacturônico. Elas podem ser classificadas como ácido poligalacturônico (PGA) ou ramnogalacturonanas do tipo I (RGI) e do tipo II (RGII) (ASPINALL, 1980).

Os ácidos poligalacturônicos (PGAs) são homopolímeros formados por unidades de α -GalpA (1 \rightarrow 4)-ligadas (CARPITA e GIBEAUT, 1993). As cadeias de PGAs podem se associar através de ligações cruzadas com o íon Ca^{2+} , formando as

chamadas zonas de junção do ácido poligalacturônico. As ramnogalacturonanas são polissacarídeos que apresentam cadeia principal de ácido galacturônico e ramnose (REID, 1997). As ramnogalacturonanas I (RG I) são heteropolímeros com cadeia principal composta por repetições do dissacarídeo $[-\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-GalpA}-(1\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow)]$ (McNEIL *et al.*, 1984; LAU *et al.*, 1985; CARPITA e GIBEAUT, 1993). As RG I podem ser intercaladas por regiões de ácido poligalacturônico em seus terminais e unidades de ramnose podem interromper longas cadeias de ácido poligalacturônico. As RG I e os PGAs formam os dois principais constituintes da matriz péctica da parede celular dos vegetais superiores (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

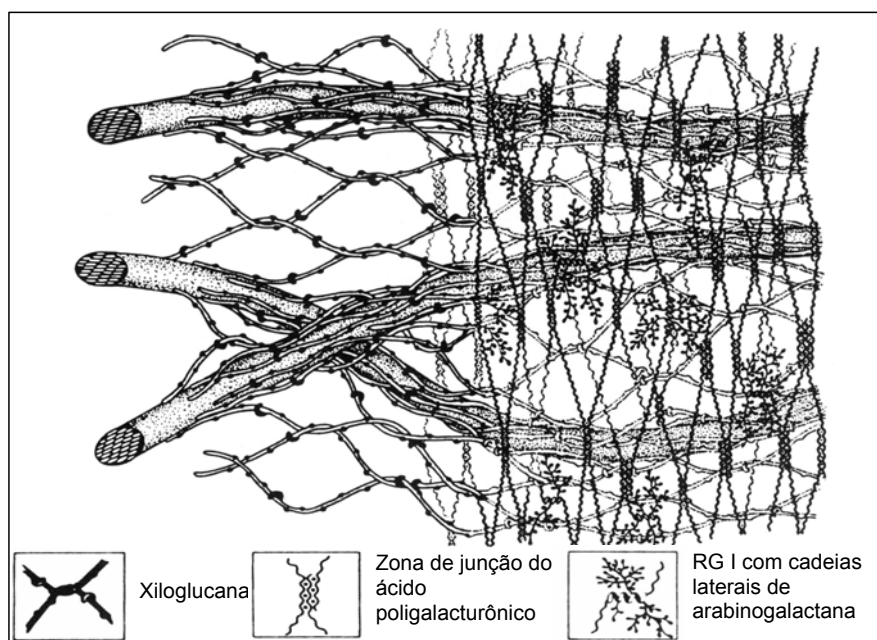


FIGURA 5 – MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA TIPO I

FONTE: Carpita e Gibeaut (1993)

As RG I apresentam altas massas molares, especialmente devido às suas longas cadeias laterais, constituídas, principalmente, de açúcares neutros. Três principais tipos de cadeias laterais de RG I são conhecidos: as arabinanas, as galactanas e as arabinogalactanas (McNEIL *et al.*, 1984; KOMALAVILAS e MORT, 1989; CIPRIANI, 2007). As cadeias laterais das RG I substituem as unidades de ramnose em O-4 e, em geral, quase metade das unidades de ramnose apresenta cadeias laterais, podendo variar acordo com o tipo celular e o estado fisiológico.

Além disso, unidades de ácido galacturônico podem ser acetiladas em O-3 (McNEIL *et al.*, 1984; KOMALAVILAS e MORT, 1989).

As ramnogalacturonanas II (RG II) diferenciam-se das RGI por possuírem, em suas cadeias laterais, monossacarídeos raros como apiose, 2-O-metil-fucose, 2-O-metil-xilose, ácido acérico, entre outros, formando estruturas altamente complexas (CARPITA e GIBEAUT, 1993; REID, 1997).

2.5.2 Arabinogalactanas

ASPINALL (1973) classificou as arabinogalactanas da parede celular em dois grandes grupos de acordo com os tipos de ligações que unem as unidades de galactose na cadeia principal. Aquelas que apresentavam cadeia principal com ligações β -(1 \rightarrow 4) foram denominadas de arabinogalactanas tipo I e aquelas que apresentavam ligações β -(1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) foram classificadas como arabinogalactanas tipo II.

As arabinogalactanas tipo I são encontradas somente em frações pécicas, associadas às RGI. Normalmente apresentam substituições em O-3 por unidades de arabinofuranose (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

As arabinogalactanas tipo II apresentam cadeia principal de unidades de galactose (1 \rightarrow 3) ligadas substituídas em O-6 por cadeias de galactose (1 \rightarrow 6) ligadas. As unidades de galactose se encontram, na maioria, substituídas em O-3 e O-6 por unidades de arabinofuranose (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Apesar de apresentarem uma estrutura geral semelhante, a estrutura fina das arabinogalactanas tipo II varia muito de espécie para espécie (CARPITA e GIBEAUT, 1993; ALBERSHEIM *et al.*, 1996). Além de galactose e arabinose, estas estruturas podem apresentar monossacarídeos ácidos como ácido glucurônico, ácido 4-O-metil-glucurônico e ácido galacturônico (STEPHEN, 1983).

As arabinogalactanas tipo II estão presentes na parede celular vegetal, ramificando ou não as ramnogalacturonanas I (STEPHEN, 1983; CIPRIANI *et al.*, 2006). Elas podem, também, apresentar-se como proteoglicanas quando covalentemente ligadas a proteínas, sendo denominadas de arabinogalactanas-

proteínas. Estas proteoglicanas estão envolvidas no reconhecimento célula-célula e na regulação da expansão e da divisão celular (FINCHER *et al.*, 1983; VARNER e LIN, 1989; SCHINDLER *et al.*, 1998).

2.6 REOLOGIA

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais sob influência de tensões (BARNES *et al.*, 1989). Dentro deste contexto, os materiais podem ser definidos como sólidos ou líquidos. Segundo Schramm (2006), sólidos ideais se deformam elasticamente, ou seja, a energia necessária para a deformação é completamente recuperada quando a tensão é removida. Conforme o mesmo autor, fluidos ideais deformam-se irreversivelmente, eles fluem sob ação de uma tensão. A energia requerida neste processo é dissipada em forma de calor e não é recuperada quando a tensão é retirada. Desta maneira, na reologia de sólidos, a propriedade de maior interesse é a elasticidade ao passo que em líquidos, a viscosidade é a propriedade mais importante (TONELI; MURR; PARK, 2005). Entre os dois comportamentos extremos, sólidos e líquidos, existem os materiais que se comportam ora como líquidos ora como sólidos, dependendo da tensão, da frequência ou da temperatura a que são expostos. Estes materiais são denominados de viscoelásticos (BARNES *et al.*, 1989).

Considerando o modelo em que um líquido é composto por várias camadas (Figura 6), quando o colocamos entre duas placas paralelas e puxamos a placa superior para a direita, a camada do líquido em contato direto com esta placa irá se movimentar enquanto que a camada em contato com a placa inferior permanecerá em repouso. Porém, em função das interações moleculares existentes, as camadas adjacentes a placa superior também começam a se movimentar para direita com velocidades diferentes, resultando em um gradiente de velocidade, que é conhecido como velocidade de cisalhamento ou taxa de cisalhamento (“shear rate”, cuja anotação é $\dot{\gamma}$). A resistência ao fluxo que os fluidos apresentam é denominada de viscosidade (η) (BARNES *et al.*, 1989, SCHRAMM, 2006).

Baixa taxa de cisalhamento

Alta taxa de cisalhamento

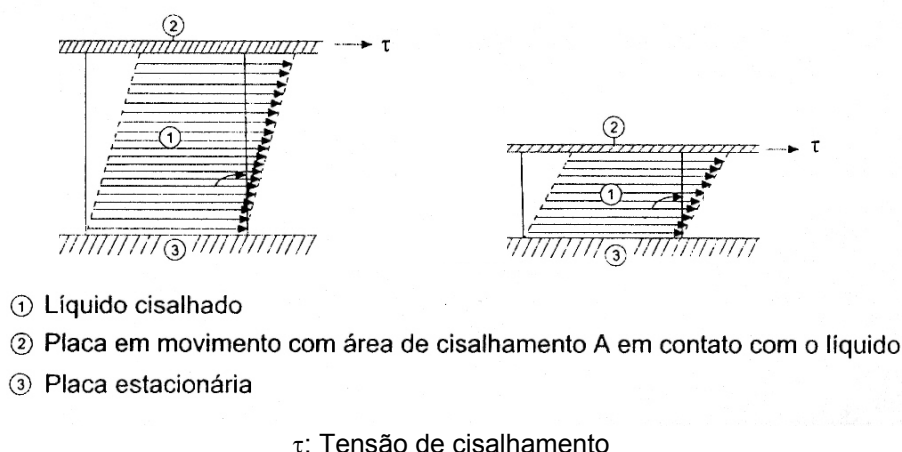


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO FLUXO DE UM LÍQUIDO ENTRE DUAS PLACAS PARALELAS
 FONTE: Schramm (2006)

Isaac Newton expressou a lei básica da viscosimetria descrevendo o comportamento de fluxo de um líquido ideal através da equação:

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \text{ (tensão de cisalhamento = viscosidade} \times \text{ taxa de cisalhamento)}$$

Onde: τ (tensão de cisalhamento) é a força aplicada tangencialmente sobre a área do líquido e é medida em Pa (Pascal); $\dot{\gamma}$ (taxa de cisalhamento) é o gradiente de velocidade nas camadas líquidas da amostra e tem a unidade s^{-1} e η é a viscosidade, expressa em Pa.s (BARNES *et al.*, 1989). Desta maneira, a viscosidade pode ser matematicamente expressa como sendo a tensão dividida pela taxa de cisalhamento.

Quando os fluidos seguem a lei de Newton da viscosimetria, a viscosidade não depende da taxa de cisalhamento e o fluido é denominado de newtoniano. O que ocorre, porém, com a maioria dos fluidos é que a viscosidade varia dependendo da taxa de cisalhamento e, desta maneira, eles são denominados de não-newtonianos. Dentre eles, destacam-se os fluidos pseudoplásticos, dilatantes e plásticos (SCHRAMM, 2006):

1- Fluidos pseudoplásticos: Os fluidos pseudoplásticos apresentam uma diminuição na viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta. Isso ocorre por que, no repouso, as partículas e/ou as cadeias poliméricas que compõem o líquido encontram-se desorientadas, entrelaçadas ou enoveladas, mantendo uma ordem interna irregular que gera uma alta viscosidade. Com o aumento das taxas de cisalhamento, as partículas se orientam em direção ao fluxo e as moléculas poliméricas se desenovelam ou se desagregam e se alinham em direção ao fluxo, isso permite uma maior facilidade de escoamento, apresentando, assim, uma diminuição da viscosidade (SCHRAMM, 2006). Este tipo de comportamento é observado na maioria das soluções concentradas de polissacarídeos.

2- Fluidos dilatantes: Os fluidos dilatantes apresentam comportamento inverso aos pseudoplásticos, ou seja, apresentam aumento de viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta (SCHRAMM, 2006).

3- Fluidos plásticos: Neste tipo de fluido, é necessária a aplicação de uma tensão inicial mínima, que provoque uma ruptura na sua estrutura, para que o material comece a fluir e perder a viscosidade de maneira dependente da taxa de cisalhamento. Ou seja, o sistema apresenta ligações intermoleculares que formam uma rede e o caracterizam como sólido até que a força externa aplicada seja superior àquela que mantém esta rede, quando se observa um ponto de ruptura do gel (SCHRAMM, 2006).

Os fluidos não-newtonianos acima descritos podem apresentar comportamento reológico dependente do tempo, sendo caracterizados como tixotrópicos ou reopéticos. Quando aos fluidos tixotrópicos é aplicada uma tensão, ocorre um decréscimo na viscosidade aparente, que tende a retornar à condição inicial apenas após um tempo de repouso. Em contrapartida, os fluidos reopéticos apresentam um acréscimo na viscosidade aparente com o tempo de aplicação da tensão e a viscosidade inicial tende a ser recuperada apenas após o repouso (TONELI; MURR; PARK, 2005).

Para analisar o comportamento de fluidos viscoelásticos, faz-se uso dos experimentos reológicos dinâmicos, em que as amostras podem ser analisadas quanto a sua viscosidade e elasticidade sendo submetidas a tensões oscilatórias.

Nestes experimentos, pode-se avaliar o comportamento de sólido e de líquido do fluido através dos valores de G' (módulo de armazenamento ou elástico) e G'' (módulo de perda ou viscoso). Se uma substância for puramente viscosa, G' será igual a zero e se ela for puramente elástica, G'' será igual a zero, porém a maioria das substâncias apresenta ambos os componentes, G' e G'' (SCHRAMM, 2006). Quando o módulo elástico (G') é superior ao módulo viscoso (G''), e ambos são independentes da frequência, o material tem caráter de sólido ou gel forte. Um gel fraco (ou solução concentrada) apresenta valores de G'' maiores do que G' em baixas frequências e, em altas frequências, ocorre uma inversão dos módulos, com G' maior do que G'' . Em soluções diluídas, o espectro dinâmico apresenta valores de G'' significativamente maiores do que G' em toda a faixa de frequência, especialmente em baixas frequências (MORRIS, 1995).

O estudo do comportamento reológico de polímeros naturais é importante, uma vez que estes podem ser aplicados em diferentes ramos da indústria. Os polissacarídeos apresentam várias características interessantes tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade e, em geral, não apresentam toxicidade. Eles têm a capacidade de modificar as características das soluções aquosas por espessar, emulsificar, estabilizar, além de serem capazes de formar géis, filmes e membranas, capacitando-os de serem utilizados em indústrias farmacêuticas, alimentícias, cosméticas, de adesivos, tintas, entre outras (LAPASIL e PRICL, 1995; MARTIN, 2003). Essas propriedades envolvem diferentes mecanismos de associação entre cadeias, as quais dependem das características individuais de cada polímero, sendo assim, géis e soluções de diferentes polímeros apresentarão formas e texturas diferentes, podendo ser aplicados em diferentes tipos de indústrias (TONELI; MURR; PARK, 2005).

Dentre os polissacarídeos industriais mais utilizados estão o amido e seus derivados, pectinas, carragenanas, agar, alginatos, polissacarídeos microbianos (ex. goma xantana) e as gomas de origem vegetal (mucilagens de sementes e gomas de exsudatos). O interesse neste trabalho está na reologia das gomas de exsudatos vegetais, que será revisada a seguir.

2.6.1 Análises reológicas de gomas de exsudatos

As propriedades viscoelásticas de dispersões de goma arábica a 6 % (m/v) foram estudadas usando testes dinâmicos. Foi verificado que a dispersão da goma arábica apresentava um comportamento típico de líquido, com G'' (módulo viscoso) maior do que G' (módulo elástico) em toda faixa de frequência analisada, porém, quando a dispersão era mantida em repouso por 5 horas, o comportamento mudava, mostrando características de uma estrutura elástica, típica de um gel. Segundo os autores, a agregação das arabinogalactanas-proteínas presentes na goma arábica pode estar influenciando esta mudança de comportamento (SANCHEZ *et al.*, 2002).

Com a análise das propriedades reológicas de interface das gomas de *Acacia senegal* (goma arábica) e *Acacia seyal*, verificou-se a importância da fração protéica da arabinogalactana para as suas propriedades viscoelásticas. A goma de *Acacia senegal* apresenta ~2% de proteína enquanto que a de *Acacia seyal* possui < 1% e, segundo os autores, a diferença na natureza e na distribuição da fração protéica é um dos fatores que faz com que a primeira forme uma interface (líquido/ar e líquido/líquido) mais elástica e mais estável do que a segunda. Após degradação proteolítica, ambas as gomas perderam a capacidade de formar filmes viscoelásticos na interface entre água e ar (ELMANAN *et al.*, 2007).

A goma do cajueiro, assim como a goma arábica, apresenta baixa viscosidade em relação às gomas karaya e tragacanto (PAULA e RODRIGUES, 1995). A análise da viscosidade intrínseca (volume hidrodinâmico) da goma do cajueiro, a 25 °C, apresentou-se diferente quando esta foi solubilizada em diferentes soluções salinas de mesma força iônica, aproximando-se de 9,0, 7,8 e 7,4 mL.g⁻¹ para as amostras em NaCl, CaCl₂ e AlCl₃, respectivamente. Este dado sugere que a cadeia do polissacarídeo se encontra mais contraída na presença de alumínio do que na presença de cálcio e de sódio (PAULA e RODRIGUES, 1995).

O comportamento reológico comparativo de dispersões de goma arábica e de goma de cajueiro, isoladas e em misturas, foi avaliado por Mothé e Rao (1999). O valor de viscosidade intrínseca determinada para a goma arábica e para a goma do cajueiro em H₂O a 20 °C foi de 0,6 e 0,1 dL.g⁻¹, respectivamente. A viscosidade intrínseca da goma arábica também foi determinada utilizando HPSEC com detector

viscosimétrico (temperatura ambiente, solvente NaNO_3 50 mM), tendo apresentado um valor de $0,23 \text{ dl.g}^{-1}$ para a goma total, sem fracionamento, e $0,87$ e $0,18 \text{ dl.g}^{-1}$, para as frações ricas em arabinogalactanas-proteínas e arabinogalactanas, respectivamente (SANCHEZ *et al.*, 2002). Tanto a goma arábica como a goma do cajueiro apresentaram comportamento não-newtoniano pseudoplástico nas concentrações 4 – 50 % (m/v) (MOTHÉ e RAO, 1999; SANCHEZ *et al.*, 2002).

A goma de mesquita (*Prosopis* spp.) é composta por uma arabinogalactana substituída semelhante à estrutura encontrada na goma arábica e suas propriedades reológicas foram avaliadas em comparação com a goma arábica por Goycoolea *et al.* (1995). A viscosidade intrínseca, em NaCl 0,1M a 20°C , das duas gomas foi semelhante, sendo $0,19$ e $0,11 \text{ dl.g}^{-1}$ para goma arábica e mesquita, respectivamente. Soluções concentradas de ambas (50 % - m/m) apresentaram espectros mecânicos típicos de soluções diluídas, com valores de G'' superiores a G' em toda a faixa de frequência analisada. Com relação ao comportamento de fluxo, soluções concentradas (40 % m/m) de goma arábica e goma de mesquita apresentaram comportamento pseudoplástico, enquanto que em concentrações menores (< 20 % - m/m) ambas apresentaram comportamento newtoniano (GOYCOOLEA *et al.*, 1995).

A goma de *Albizia lebbbeck* é composta por um polissacarídeo de baixa viscosidade, que se assemelha à goma arábica e à goma do cajueiro, com viscosidade intrínseca, medida em NaCl 1M a 25°C , de $0,23 \text{ dl.g}^{-1}$. Quando medida em AlCl_3 0,170 M, este valor foi reduzido para $\sim 0,16 \text{ dl.g}^{-1}$, refletindo a intensa contração da cadeia na presença deste sal (PAULA; SANTANA; RODRIGUES, 2001).

A goma de *Enterolobium contortisilliquum*, composta por ramnose (18%), arabinose (24%), galactose (38%) e ácido urônico (19%), é classificada como uma arabinogalactana substituída. Ela apresenta viscosidade intrínseca em NaCl 1M a 25°C de $0,86 \text{ dl.g}^{-1}$. Na concentração de 1 % (m/v), esta goma apresentou comportamento newtoniano e em concentrações maiores apresentou comportamento não-newtoniano pseudoplástico (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

A goma tragacanto apresenta uma fração solúvel em água, denominada de tragacantina, composta pelo ácido tragacântico (glicanoramnogalacturonana) e pela arabinogalactana, e outra insolúvel, denominada de bassorina, com composição similar à tragacantina, porém, com menor teor de ácidos urônicos, e que forma

dispersões viscosas em água. A goma tragacanto e suas frações isoladas (1%, m/v) apresentaram comportamento pseudoplástico. A bassorina formou solução mais viscosa. Nos experimentos de varredura de frequência, a bassorina (1 %, m/v) apresentou um comportamento de gel mais forte do que o encontrado para a goma sem fracionamento (1 %, m/v), em contrapartida a tragacantina (1 %, m/v) apresentou um comportamento de solução concentrada e não de gel verdadeiro. A adição de NaCl 0,1M aos sistemas decresceu a força dos géis. A tragacantina (M_w $1,6 \times 10^6$ g.mol⁻¹) apresentou valor de viscosidade intrínseca de 19,2 dl.g⁻¹ e, após sonicação por 0,5, 1, 1,5 e 6 minutos, foi analisada por HPSEC-MALLS, com detector viscosimétrico, gerando frações com M_w menores e valores de viscosidade intrínseca de 12,55, 10,96, 8,91 e 4,42 dl.g⁻¹, respectivamente, sugerindo que a viscosidade intrínseca é dependente da massa molar (MOHAMMADIFAR *et al.*, 2006).

Análises reológicas da goma “chicha”, retirada de árvores da espécie *Sterculia striata*, foram realizadas em comparação com a goma comercial karaya (*Sterculia* spp.). Estruturalmente, estas gomas são compostas por glicanoramnogalacturonanas ramificadas parcialmente acetiladas. Frente a variações de frequências, o polissacarídeo da goma *S. striata* apresentou um comportamento de gel verdadeiro ($G'/G'' > 3$) nas concentrações 4, 5 e 6 % (m/v), enquanto que o polissacarídeo da goma karaya apresentou este comportamento a partir da concentração 2 % (m/v). Os géis formados por estes polissacarídeos (5 %, m/v) possuem termoestabilidade na faixa de 10 – 90° C e perdem sua força quando solubilizados em NaCl 0,1M. A deacetilação do polissacarídeo da goma de *S. striata* leva à perda do seu comportamento de gel, uma vez que resulta em valores de G'' maiores do que os de G' . Estes dados indicam que é necessária a presença dos grupos acetil para promover as interações entre as cadeias polissacarídicas que resultam na formação de géis fortes nas gomas do gênero *Sterculia* (BRITO *et al.*, 2005).

Os dados de literatura mostram que muitas variáveis influenciam as características reológicas das gomas de exsudatos, entre elas estão a estrutura química fina do polissacarídeo, a conformação molecular e as interações inter- e intra-moleculares. A Tabela 1 mostra de maneira resumida e comparativa os dados de literatura expostos neste item sob alguns aspectos químicos e reológicos das gomas de exsudatos descritas. Não foram encontrados dados na literatura sobre a

reologia da goma de exsudato produzida pelo pessegueiro (*Prunus persica*), motivando o desenvolvimento destas análises neste trabalho.

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E REOLÓGICAS E PRINCIPAIS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE GOMAS DE EXSUDATOS DESCRITAS NA LITERATURA (continua)

Goma de exsudato	Estrutura química ^a	Solvente utilizado	T (°C)	[η] dl.g ⁻¹	[α] (% m/v)	Comportam. de fluxo ^b	Principais aplicações industriais
	Tipo de ligação na cadeia principal						
goma de cajueiro ¹ (<i>Anacardium occidentale</i>)	AG-ácida β -(1→3)	NaCl 1M	25	0,09*	nd.	nd.	nd.
		CaCl ₂	25	0,078*			
		0,334M AlCl ₃ 0,170M	25	0,074*			
goma de cajueiro ² (<i>Anacardium occidentale</i>)	AG-ácida β -(1→3)	H ₂ O	20	0,1	4 – 50	pseudoplástico	nd.
goma arábica ^{2,3} (<i>Acacia senegal</i>)	AG-ácida β -(1→3)	H ₂ O	20	0,6	4 – 50	pseudoplástico	estabilizante, emulsificante, espessante (indústria alimentícia, farmacêutica, de tintas e adesivos) ⁸
goma arábica ³ (<i>Acacia senegal</i>)	AG-ácida β -(1→3)	NaNO ₃ 50 mM	t.a.	0,23	3 - 32	pseudoplástico	estabilizante, emulsificante, espessante (indústria alimentícia, farmacêutica, de tintas e adesivos) ⁸
AGPs da goma arábica ³ (<i>Acacia senegal</i>)	AGP β -(1→3)	NaNO ₃ 50 mM	t.a.	0,87	nd.	nd.	nd.
AGs da goma arábica ³ (<i>Acacia senegal</i>)	AG β -(1→3)	NaNO ₃ 50 mM	t.a.	0,18	nd.	nd.	nd.

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E REOLÓGICAS E PRINCIPAIS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE GOMAS DE EXSUDATOS DESCRITAS NA LITERATURA (conclusão)

goma arábica ⁴ (<i>Acacia senegal</i>)	AG-ácida β -(1→3)	NaCl 0,1M	20	0,19	< 30 **	newtoniano	estabilizante, emulsificante, espaçante (indústria alimentícia, farmacêutica, de tintas e adesivos) ⁸
goma de mesquita ⁴ (<i>Prosopis spp.</i>)	AG-ácida β -(1→3)	NaCl 0,1M	20	0,11	< 30 **	newtoniano	indústria têxtil, de tintas e de cola ⁴
goma de <i>Albizia</i> <i>lebbbeck</i> ⁵	AG-ácida β -(1→3)	NaCl 1M AlCl ₃ 0,170M	25 25	0,23 0,16	nd.	nd.	nd.
goma de <i>Enterolobium</i> <i>contortisiliquum</i> ⁶	AG-ácida β -(1→3)	NaCl 1M H ₂ O	25 25	0,86	1 > 1	newtoniano pseudoplástico	nd.
goma tragacanto ⁷ (<i>Astragalus gossypinus</i>)	RG (~70%) α -(1→4) AG (~30%) ↑ β -(1→6) ↓ β -(1→3)	H ₂ O NaCl 0,1M	25 25	nd.	1 1	pseudoplástico pseudoplástico	espaçante e estabilizante (indústrias- alimentícia, farmacêutica, cosmética e têxtil) ⁸
tragacantina (fração solúvel–tragacanto) ⁷ (<i>Astragalus gossypinus</i>)	RG (~70%) α -(1→4) AG (~30%) ↑ β -(1→6) ↓ β -(1→3)	H ₂ O NaCl 0,1M	25 25	19,2	1 1	pseudoplástico pseudoplástico	nd.
bassorina (fração insolúvel – tragacanto) ⁷ (<i>Astragalus gossypinus</i>)	nd.	H ₂ O NaCl 0,1M	25 25	nd.	1 1	pseudoplástico pseudoplástico	nd.

[]: concentração; * no artigo original estes valores são expressos em ml.g⁻¹; ** valores expressos na relação m/m; ¹ PAULA e RODRIGUES, 1995, ² MOTHÉ e RAO, 1999, ³ SANCHEZ *et al.*, 2002, ⁴ GOYCOOLEA *et al.*, 1995, ⁵ PAULA; SANTANA; RODRIGUES, 2001, ⁶ OLIVEIRA *et al.*, 2001, ⁷ MOHAMMADIFAR *et al.*, 2006, ⁸ SANFORD e BAIRD, 1983; t.a.-temperatura ambiente (não expressa em °C no artigo original); nd.-informação não consta na bibliografia analisada; ^a: AG-arabinogalactana, AGP-arabinogalactana-proteína, RG-glicanoramnogalacturonana; ^b comportamento de fluxo analisado através de curvas de viscosidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS GOMAS DE EXSUDATOS E DOS FRUTOS

As gomas estudadas nesta pesquisa são gomas de exsudatos vegetais e, com o intuito de simplificar esta nomenclatura, a partir deste item, elas serão referidas apenas como gomas.

As gomas do pessegueiro (*Prunus persica*) (FIGURA 7 – A e B) utilizadas para as análises estruturais foram obtidas na cidade de Palmas (PR). Dentre estas, a goma do tronco (*Prunus persica* ‘junegold’) (12 g - massa seca) foi coletada em fevereiro de 2004 na sede do IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná – Governo do Estado) pela autora deste trabalho com autorização do técnico agrícola responsável - Antonio Bonkerner. Esta goma foi coletada especialmente nos locais onde as plantas foram podadas e onde a árvore apresentava ferimentos. A goma do fruto (*Prunus persica* ‘aerogil’) (2 g – massa úmida) foi coletada em fevereiro de 2005, em uma propriedade particular, pela bióloga Mariana S. Araújo Pereira e gentilmente cedida para este trabalho

A goma do tronco do pessegueiro (*Prunus persica* ‘chimarrita’) utilizada para as análises reológicas (95 g – massa seca) e a goma do tronco da nectarineira (FIGURA 1C) (*Prunus persica* var. *nucipersica* ‘sun red’) (113 g – massa seca) foram coletadas em dezembro de 2005 na cidade da Lapa (PR), no pomar da empresa FRUTALAPA Agrocomercial Ltda., por intermédio de Eloy Marcelo Reynand dos Santos (IAPAR-Lapa).

Os pêssegos nacionais (polpa amarela) utilizados para a análise dos polissacarídeos da polpa foram obtidos através de um produtor local, na cidade de Curitiba (PR), em fevereiro de 2007.

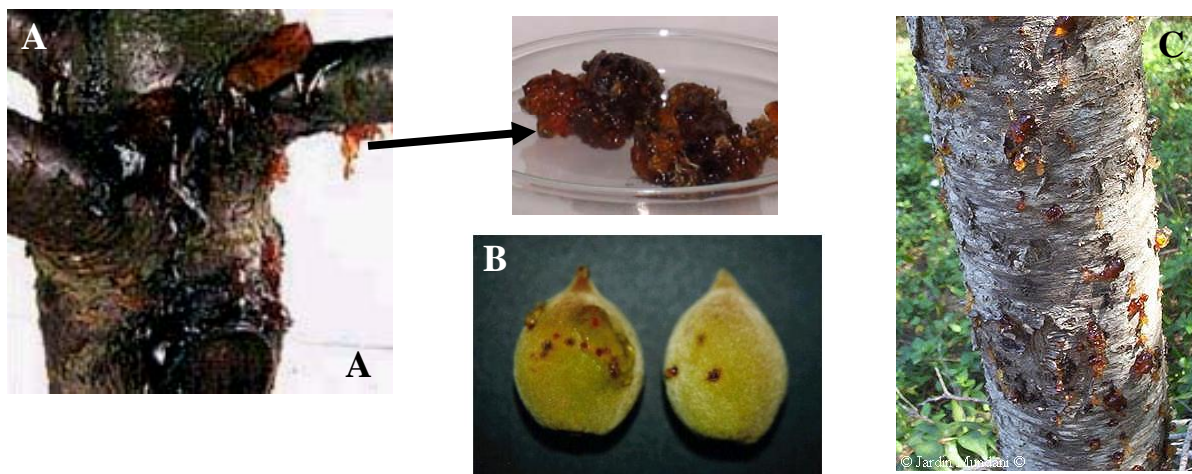


FIGURA 7 – GOMAS DO TRONCO (A) E DOS FRUTOS (B) DO PESSEGUEIRO E DO TRONCO DA NECTARINEIRA (C)

3.2 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS DAS GOMAS

As gomas brutas foram submetidas à extração aquosa na concentração de 1,0 % (m/v) (gomas pessegueiro) ou 2,0 % (m/v) (goma nectarineira), em temperatura ambiente, sob agitação mecânica constante durante aproximadamente 16 h. As dispersões resultantes foram filtradas em um tecido fino para remoção dos fragmentos insolúveis (que tinham aparência de grumos de géis), os quais foram submetidos a outro ciclo de extração aquosa. Após filtração, os extratos obtidos foram adicionados de etanol em excesso (3 x vol.), centrifugados (8500 rpm / 5°C / 20 min) e os materiais precipitados foram ressuspensos em água, dialisados contra água corrente (24 h), liofilizados e denominados de PPN (polissacarídeo nativo da goma do tronco do pessegueiro – 4,5 g – 38% de rendimento em relação à massa seca da goma bruta), PPNF (polissacarídeo nativo da goma produzida pelo fruto – 0,2 g – 9% de rendimento em relação à massa úmida da goma bruta) e PPNEC (polissacarídeo nativo da goma do tronco da nectarineira – 59 g – 52% de rendimento em relação à massa seca da goma bruta). Os resíduos obtidos da

extração aquosa foram submetidos a extrações alcalinas com KOH 1% (m/v), na presença de NaBH_4 , sob agitação, em temperatura ambiente durante 16 h. Esta extração permitiu que a maior parte dos resíduos obtidos após extrações aquosas fossem solubilizados, exceto no caso da goma de nectarineira, em que uma fração insolúvel ainda foi detectada. Os extratos alcalinos obtidos foram neutralizados com HOAc, precipitados com excesso de etanol (3 x vol.) e centrifugados (8500 rpm / 5°C / 20 min). As frações precipitadas foram ressuspensas, dialisadas, liofilizadas e denominadas de PPNA (polissacarídeo nativo extraído com álcali da goma do tronco do pessegueiro – 5 g – 42% de rendimento em relação à massa seca da goma bruta), PPNFA (polissacarídeo nativo extraído com álcali da goma produzida pelos frutos – 0,14 g – 6% de rendimento em relação à massa úmida da goma bruta) e PPNECA (polissacarídeo nativo da goma do tronco da nectarineira – 4 g – 4% de rendimento em relação à massa seca da goma bruta). O esquema geral de obtenção dos polissacarídeos nativos das gomas está apresentado na FIGURA 8.

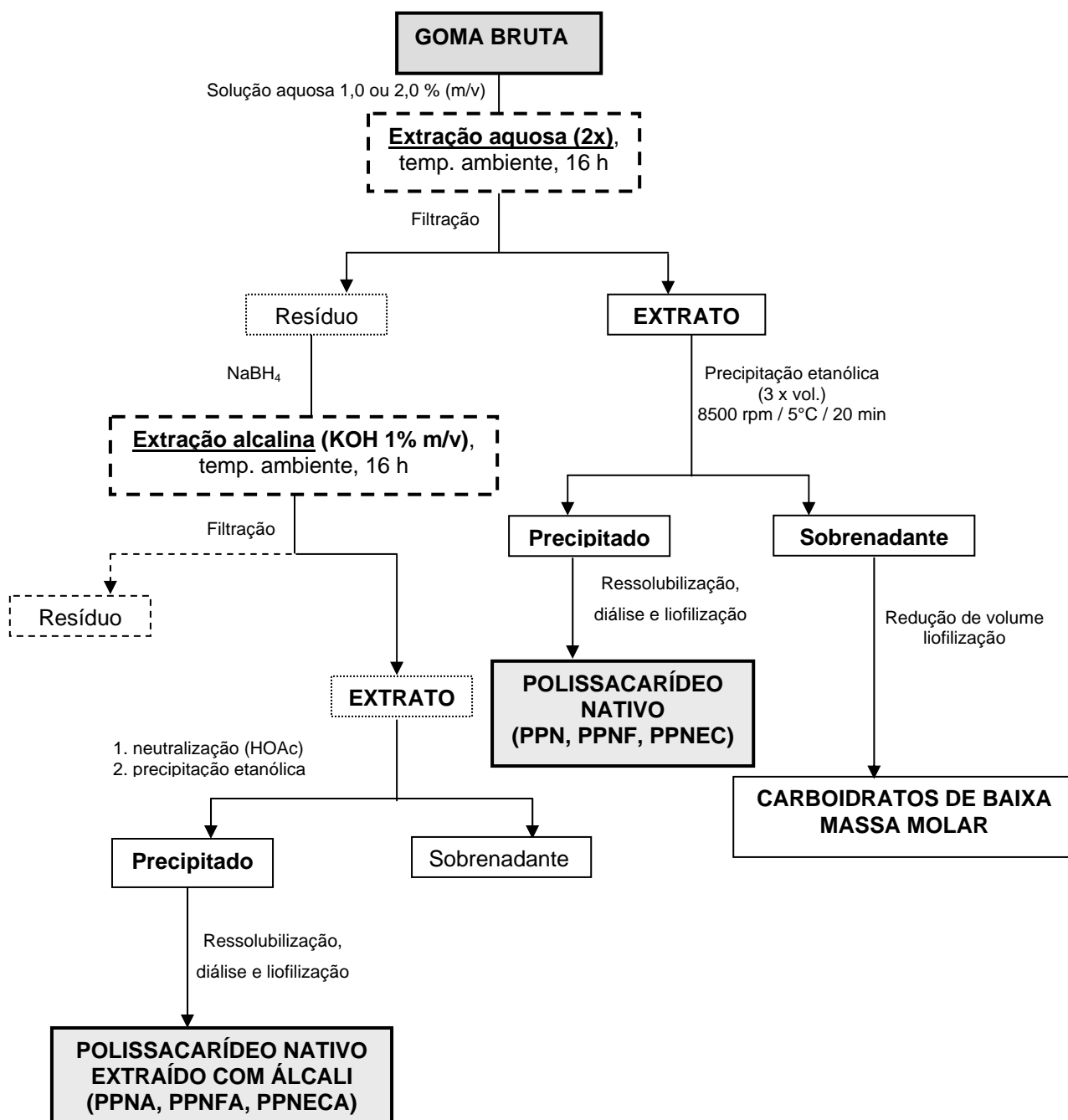


FIGURA 8 - METODOLOGIA UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS E POLISSACARÍDEOS NATIVOS EXTRAÍDOS COM ÁLCALI DAS GOMAS DO PESSEGUEIRO E DA NECTARINEIRA

3.3 DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS REALIZADAS NO POLISSACARÍDEO NATIVO OBTIDO DA GOMA DO TRONCO DO PESSEGUIRO (PPNA)

Com o intuito de caracterizar a estrutura química fina do polissacarídeo nativo da goma do tronco do pessegueiro, PPNA, os métodos sumarizados na Figura 9 foram utilizados e serão descritos a seguir.

3.3.1 Oxidação com periodato de sódio e degradação controlada de Smith

O procedimento de degradação controlada de Smith foi realizado segundo Dyer (1956), Goldstein *et al.* (1965), Hay, Lewis e Smith (1965) e Gorin, Horitsu e Spencer (1965) e está esquematizado na FIGURA 9. Em uma solução aquosa de PPNA (1 % m/v) foram adicionados 100 ml do agente oxidante metaperiodato de sódio (NaIO_4) 0,1 M. A solução permaneceu durante 72 horas no escuro, sob agitação magnética. A reação foi interrompida com a adição de etilenoglicol, sendo posteriormente dialisada contra água corrente durante 48 horas. A fração foi, então, concentrada em evaporador rotatório e NaBH_4 (pH 10,0) foi adicionado como agente redutor. Após ~16 h, a solução foi neutralizada com HOAc e posteriormente dialisada contra água corrente. Uma alíquota do poliálcool resultante foi retirada para análise de composição monossacarídica e de metilação, e o restante foi submetido à hidrólise ácida parcial em pH 2,0 com TFA, sob refluxo (~96 °C), por 40 min. A solução, após ajuste de pH para 5,0, foi submetida à precipitação etanólica (4 x vol.). O precipitado formado, que corresponde ao polissacarídeo degradado (PPNAS), foi ressuspenso em água, dialisado (membrana com limite de exclusão de 2000 Da) e liofilizado (189 mg – 19% de rendimento em relação ao PPNA). Em outro experimento, o PPNA (2,0 g) foi submetido a dois ciclos consecutivos de degradação controlada de Smith originando uma fração com rendimento extremamente baixo (9 mg – 0,45% de rendimento) que foi denominada PPNAS2.

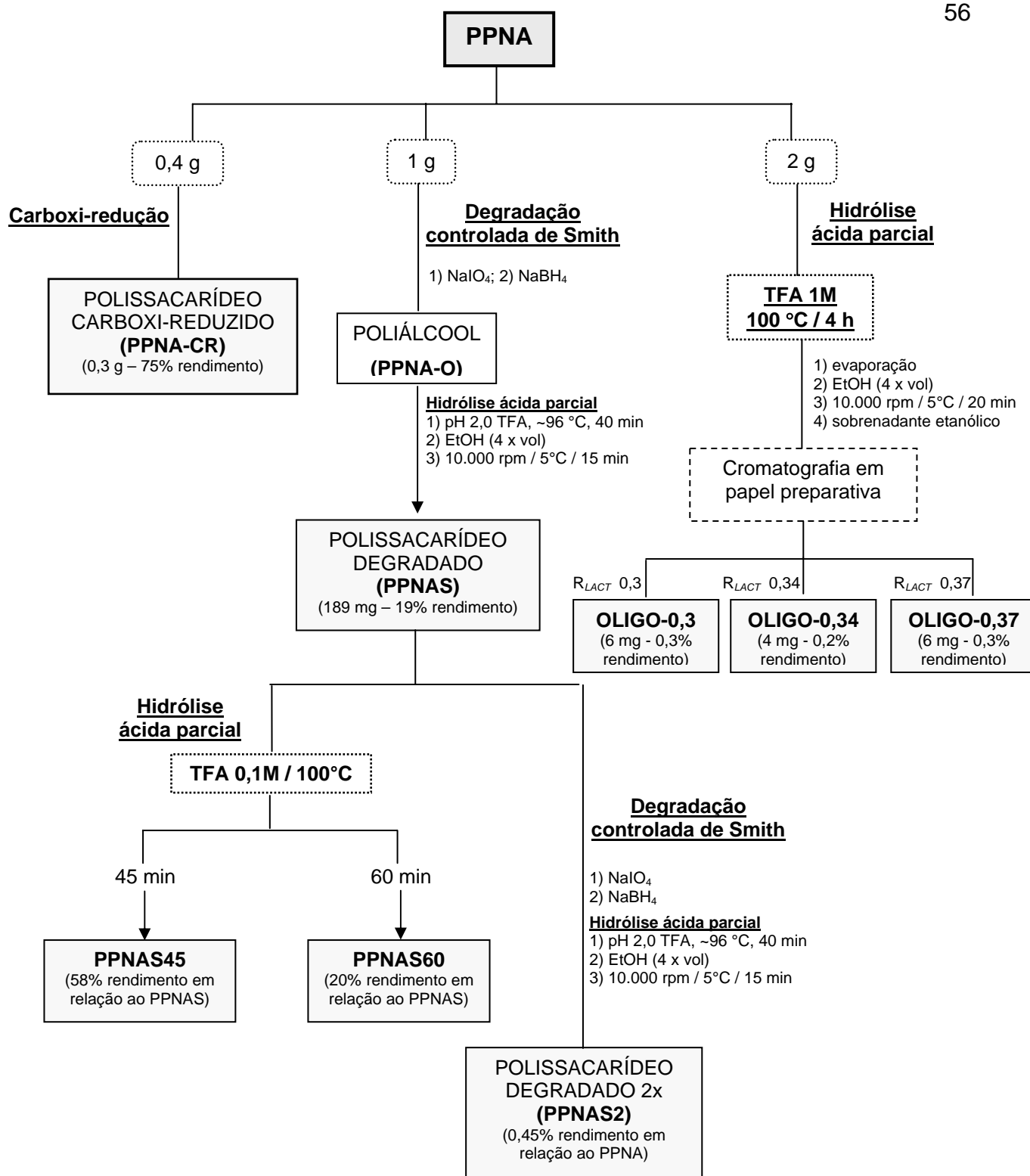


FIGURA 9 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA NA CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA FINA DO POLISSACARÍDEO NATIVO DA GOMA DO TRONCO DO PESSEGUEIRO (PPNA)

Com o intuito de comparar os polissacarídeos nativos das gomas do pessegueiro e da nectarineira, o PPNEC também foi submetido à oxidação com periodato de sódio, redução com NaBH_4 e o poliálcool resultante foi analisado quanto à composição monossacarídica e metilação.

3.3.2 Hidrólise ácida parcial no polissacarídeo obtido após degradação controlada de Smith (PPNAS)

O polissacarídeo PPNAS (200 mg), resultante de degradação controlada de Smith foi hidrolisado com TFA 0,1 M (20 ml) em estufa a 100 °C durante 45 ou 60 minutos. Após adição de NaOH (até pH 5,0), as soluções foram precipitadas com etanol em excesso (4 x vol.), centrifugadas (10000 rpm / 5°C / 20 min), dialisadas (membranas com limite de exclusão 2000 Da) e liofilizadas, dando origem às frações PPNAS45 (45 min) e PPNAS60 (60 min) cujos rendimentos corresponderam a 58% e 20% em relação ao PPNAS, respectivamente.

3.3.3 Produção de oligossacarídeos ácidos a partir de hidrólise ácida parcial

Dois gramas de PPNA foram solubilizados em 50 ml de água e, posteriormente, foram adicionados 50 ml de TFA 1M. Esta solução permaneceu em estufa a 100 °C, por 4 horas, sendo posteriormente levada à secura em evaporador rotatório. Após ressolubilização em pequeno volume de água, a solução foi precipitada com etanol (4 x vol.), e o precipitado foi retirado por centrifugação (10000 rpm / 5°C / 20 min). O sobrenadante etanólico, após secura e solubilização em pequeno volume de água, foi fracionado em cromatografia em papel preparativa (papel Whatman 3MM) de onde foram isoladas 3 bandas com R_{Lact} de 0,30, 0,34 e 0,37. Estas frações foram denominadas de oligo-0,30 (6 mg), oligo-0,34 (4 mg) e oligo-37 (6 mg), respectivamente. As cromatografias foram eluídas com o solvente *n*-butanol:piridina:água 5:3:3 (v/v) e reveladas com nitrato de prata (AgNO_3 saturada

em acetona 1:1000 v/v) e hidróxido de sódio (NaOH 40% em etanol 1:250 v/v) (TREVELYAN; PROCTER; HARRISON, 1950).

3.3.4 Carboxi-redução

O procedimento de carboxi-redução (TAYLOR e CONRAD, 1972) foi realizado com o objetivo de reduzir as carboxilas dos seus ácidos urônicos transformando-os nos açúcares neutros correspondentes, a fim de se identificar o tipo de ácido urônico presente na amostra. O polissacarídeo (400 mg) foi solubilizado em tampão MES 0,2 M (20 ml), pH 4,75, sendo posteriormente adicionado de carbodiimida [ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida] (1,156 g). Após agitação magnética durante 1 hora, o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de tampão TRIS / HCl (2 M; pH 7,0) (6 ml). A amostra foi reduzida com NaBH₄ ou NaBD₄ (de maneira a perfazer uma concentração de 2M na solução) durante 16 h e, depois de neutralizada, foi dialisada exaustivamente e liofilizada (365 mg). Este ciclo foi repetido mais duas vezes gerando o polissacarídeo carboxi-reduzido denominado PPNA-CR (300 mg – 75% de rendimento em relação ao PPNA).

3.4 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA POLPA DO PÊSSEGO

Foram utilizados 3 kg de pêssegos para a extração dos polissacarídeos da polpa do pêssego. Os frutos foram descascados e as sementes foram retiradas, sendo a polpa batida com água no liquidificador até a formação de um material homogêneo. Este material foi precipitado com etanol (3 x vol.) para a retirada dos compostos de baixa massa molar. Ao precipitado obtido adicionou-se água, e a mistura permaneceu sob agitação mecânica durante 16 horas, à temperatura ambiente (~20 °C). Decorrido este período, a solução foi centrifugada (9000 rpm /

10 °C / 20 min), gerando um sobrenadante, denominado extrato aquoso (EAF-11 g), e um resíduo insolúvel. Este resíduo foi submetido à extração aquosa a quente em banho maria fervente, sob agitação mecânica durante 3 horas. Após este processo, o material foi centrifugado (9000 rpm / 10 °C / 20 min) gerando um sobrenadante, denominado extrato aquoso a quente (EAQ – 5 g), e um resíduo insolúvel (15 g). Devido ao interesse nas moléculas solúveis em água, as análises subsequentes foram realizadas com os extratos aquosos. A Figura 10 apresenta esquematicamente o processo anteriormente descrito.

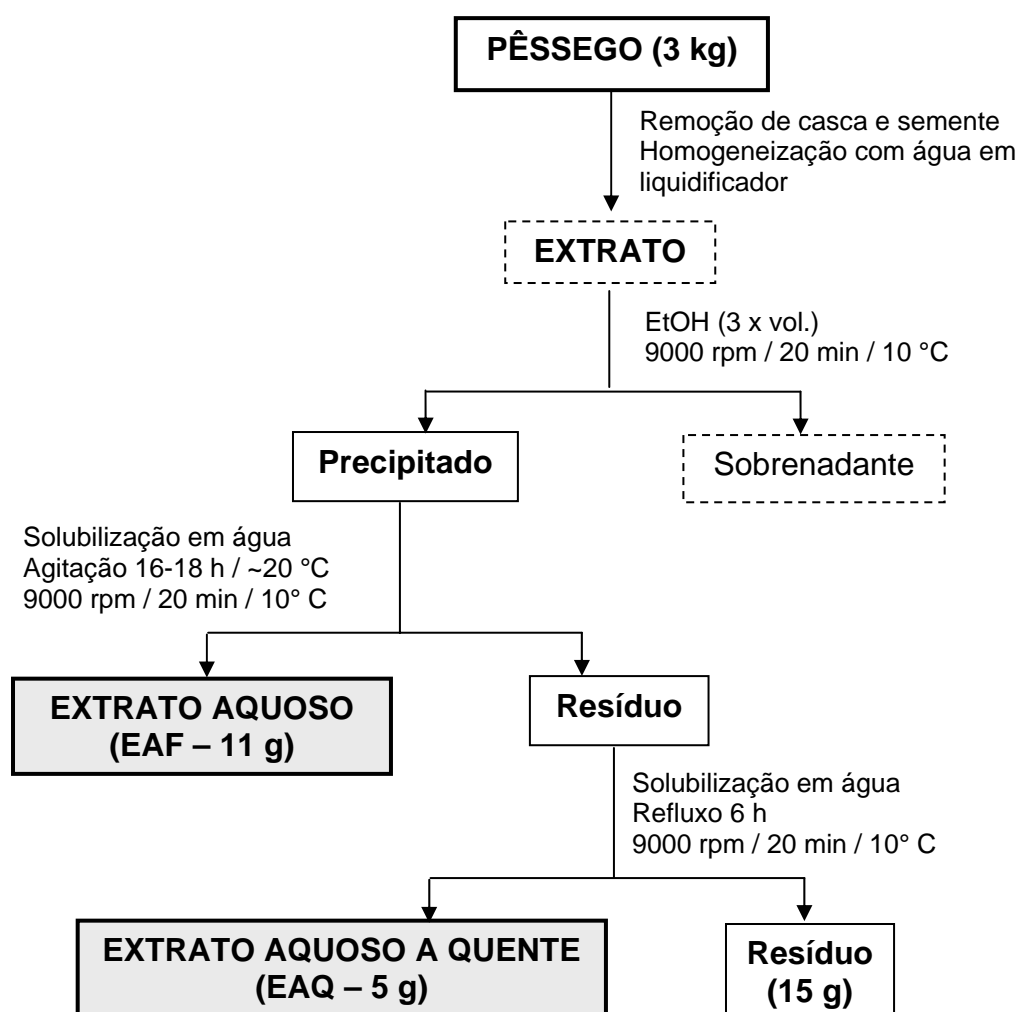


FIGURA 10 – METODOLOGIA UTILIZADA PARA OBTER OS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA POLPA DO PÊSSEGO

3.4.1 Fracionamento dos polissacarídeos presentes na polpa do pêssgo

O extrato aquoso, EAF, foi escolhido para ser submetido aos processos de purificação devido ao seu maior rendimento. Diferentes combinações de métodos foram empregadas na tentativa de purificar uma fração rica em arabinogalactanas a partir da polpa. A estratégia mais eficiente será descrita a seguir.

Inicialmente, a fração EAF (1,8 g) foi tratada com TCA 5% (v/v) com o intuito de remover as proteínas presentes nesta fração (11%). O material insolúvel em TCA foi separado por centrifugação (EAF-PTCA / 0,151 g – 8% de rendimento em relação a EAF) e o fracionamento seguinte foi realizado com o material solúvel em TCA após neutralização, diálise e liofilização (EAF-STCA / 1,6 g – 89% de rendimento em relação a EAF).

A fração EAF-STCA foi submetida ao processo de congelamento e descongelamento, ou gelo e degelo, que consiste em solubilizar a amostra em água destilada e, posteriormente, congelá-la. Após congelamento, a amostra é retirada do freezer e permanece à temperatura ambiente até completo descongelamento, sendo o material insolúvel em água fria retirado por centrifugação (GORIN e IACOMINI, 1984). Após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, foram obtidas duas frações, uma solúvel em água fria (EAF-SG / 0,390 g – 22% de rendimento em relação a EAF) e outra insolúvel em água fria (EAF-PG / 1,1 g – 61% de rendimento em relação a EAF).

Como o objetivo do fracionamento era obter uma fração rica em arabinogalactanas e, pelos dados de literatura, este tipo de estrutura era solúvel em água fria (CIPRIANI *et al.*, 2006), a fração EAF-SG (340 mg) foi submetida à precipitação com solução de Fehling (JONES, J. K. N. e STOODLEY, 1965). Neste método, foram utilizadas duas soluções, uma denominada de A, composta por tartarato de potássio e sódio e KOH (173 g + 125 g + H₂O q.s.p. 500 ml, respectivamente) e outra denominada de B, composta por sulfato de cobre 5.H₂O (55,7 g + H₂O q.s.p. 500 ml). A amostra (340 mg) foi solubilizada diretamente na solução A (17 ml) e, após completa solubilização, o mesmo volume da solução B foi adicionado. A mistura foi mantida sob agitação vigorosa durante aproximadamente 6 horas. Em seguida, o precipitado formado foi separado do sobrenadante por

centrifugação (11000 rpm / 30 min / 5 °C), e as duas frações foram neutralizadas com HOAc e dialisadas exaustivamente contra água corrente. Após diálise, as frações foram tratadas com resina catiônica (DOWEX – forma H⁺), filtradas, e os filtrados novamente dialisados. Após redução de volume e liofilização, foram obtidas as frações denominadas EAF-SF (150 mg – 8% de rendimento em relação a EAF) e EAF-PF (8 mg – 0,4% de rendimento em relação a EAF), correspondentes ao sobrenadante e ao precipitado de Fehling, respectivamente. O princípio da precipitação com solução de Fehling baseia-se na interação do cobre (presente na solução B) com hidroxilas vicinais livres presentes nos polissacarídeos, produzindo um complexo insolúvel. Aquelas estruturas que não possuem esta característica, em teoria, permanecem em solução (JONES, J. K. N. e STOODLEY, 1965).

Como o sobrenadante de Fehling (EAF-SF / 138 mg) ainda apresentava-se heterogêneo, ele foi aplicado em uma coluna de troca aniônica (DOWEX – forma Cl⁻) com o intuito de fracionar os polissacarídeos ácidos presentes nesta fração. A eluição foi feita com água e NaCl nas concentrações 0,3, 0,5, 1, 2, 3 e 4M originando as frações EAF-SFH₂O (35 mg - 2% de rendimento em relação a EAF), EAF-SF03 (16 mg – 0,9% de rendimento em relação a EAF), EAF-SF05 (5 mg – 0,3% de rendimento em relação a EAF), EAF-SF1 (3 mg – 0,2% de rendimento em relação a EAF), EAF-SF2 (3 mg – 0,2% de rendimento em relação a EAF), EAF-SF3 (11 mg – 0,6% de rendimento em relação a EAF) e EAF-SF4 (58 mg - 3% de rendimento em relação a EAF), respectivamente. As eluições da coluna foram monitoradas pela dosagem de açúcar total pelo método do fenol-H₂SO₄ (DUBOIS *et al.*, 1956).

A Figura 11 mostra, de maneira esquemática, a metodologia descrita utilizada para o fracionamento dos polissacarídeos da polpa.

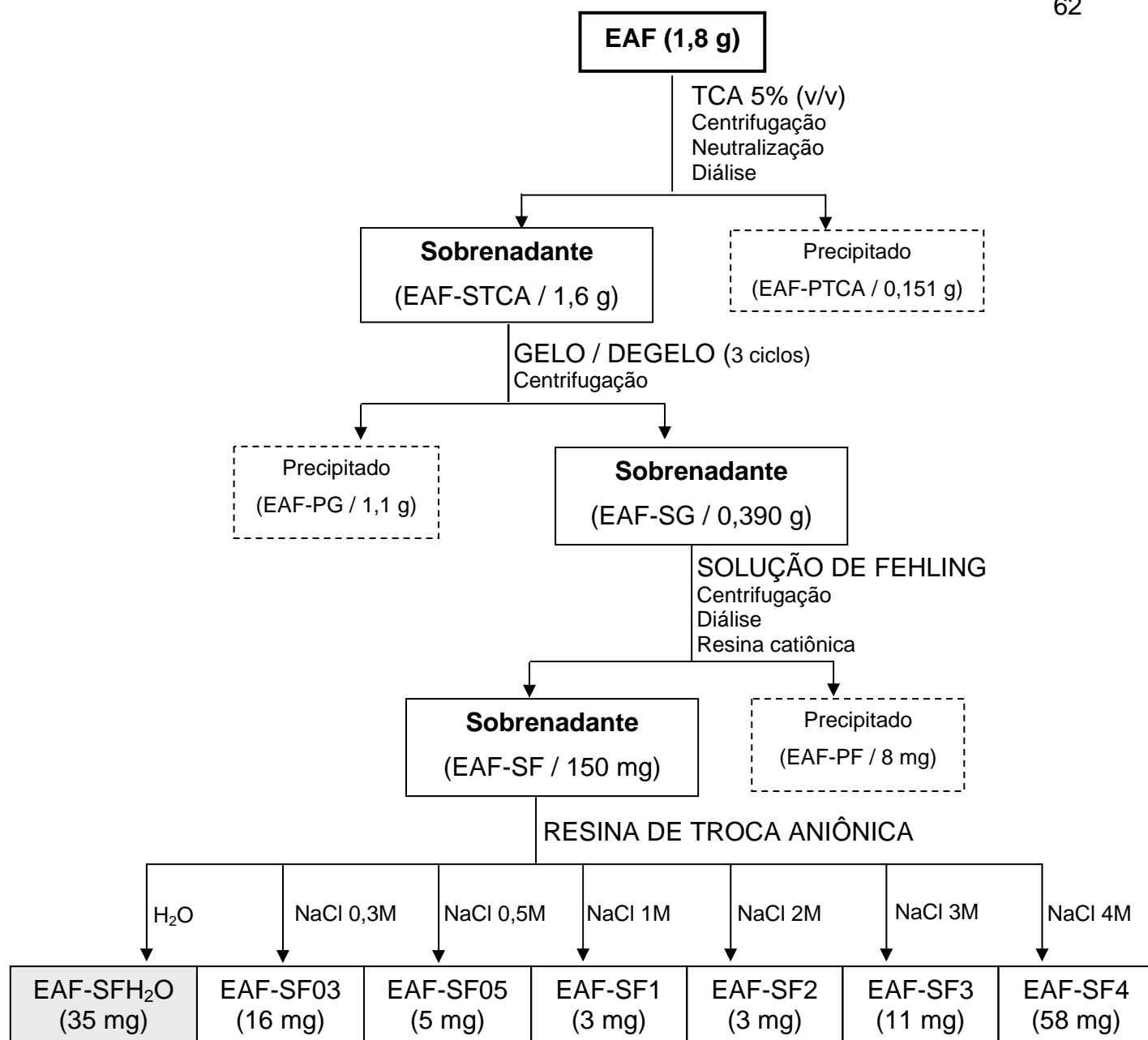


FIGURA 11 – METODOLOGIA UTILIZADA NO FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA POLPA DO PÊSSEGO

3.5 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS CARBOIDRATOS OBTIDOS

3.5.1 Análise de composição monossacarídica

Aproximadamente 2 mg das frações obtidas foram hidrolisadas com TFA 1M durante 8 horas, a 100 °C (GORIN *et al.*, 1996). As frações provenientes da polpa do fruto foram hidrolisadas com TFA 2M. Após hidrólise, o ácido foi removido por evaporação, e o material resultante foi solubilizado em pequeno volume de água, sendo uma parte reservada para cromatografia em papel analítica e o restante submetido à redução com NaBH₄ ou NaB²H₄ (especialmente para amostras metiladas), por 12 h, em temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Decorrido este tempo a solução foi tratada com resina catiônica (DOWEX 50W x 8, forma H⁺) até pH 4,0 para remoção de íons sódio, filtrada e seca em evaporador rotatório. Posteriormente, foi lavada exaustivamente com metanol e novamente seca. Os derivados alditóis assim obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético:piridina (1:1, v/v) (WOLFROM e THOMPSON, 1963b) por 12 h, em temperatura ambiente. O processo foi interrompido pela adição de gelo moído ao sistema. Os alditóis acetatos obtidos foram extraídos com clorofórmio e a fase clorofórmica foi lavada sucessivas vezes com solução aquosa de CuSO₄, a 3% (m/v), para remoção da piridina residual. Para promover a total desidratação da fase clorofórmica, sulfato de sódio anidro foi adicionado. Os alditóis acetatos foram então analisados em GLC e/ou GC-MS.

3.5.2 Determinação de homogeneidade e massa molar (M_w)

A análise de homogeneidade e a determinação da massa molar das amostras foram realizadas em HPSEC-MALLS, que utiliza um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), modelo WATERS 2410, acoplado a um detector de índice de refração conectado em série com um detector de espalhamento de luz (modelo

DAWN DSP, Wyatt Technologies Corporation, EUA). Foram utilizadas quatro colunas WATERS Ultrahydrogel dispostas de forma seqüencial e apresentando diferentes limites de exclusão : 7×10^6 (coluna 2000); 4×10^5 (coluna 500); 8×10^4 (coluna 250) e 5×10^3 (coluna 120). O eluente, NaNO_2 0,1 M com NaN_3 a 0,02 % (m/v), foi administrado na coluna através de uma bomba peristáltica WATERS 515. As amostras foram solubilizadas em NaNO_2 0,1 M e ultrafiltradas em membranas de éster de celulose MILLIPORE, de porosidade 0,22 μm . Para o cálculo da massa molar, cada amostra teve seu valor de dn/dc (taxa de variação do índice de refração com relação à concentração) determinado, já que este valor é específico para cada uma. Os valores obtidos para PPNA, PPNF, PPNAS60 e PPNEC foram de 0,143, 0,135, 0,141 e 0,151, respectivamente. Para esta análise cada fração foi solubilizada em quatro ou cinco diferentes concentrações (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg.mL^{-1}) e cada uma das soluções foi analisada pelo detector de índice de refração. O cálculo do dn/dc e da massa molar foi feito através do software ASTRA 4.70.07.

3.5.3 Análises de metilação

A metilação dos polissacarídeos foi realizada segundo CIUCANU e KERÉK (1984), onde 5 a 10 mg da amostra foram solubilizadas em Me_2SO (2 ml) sendo, após completa dissolução, adicionadas de NaOH pulverizada (em excesso) e 2 ml de iodeto de metila (CH_3I). A mistura reacional permaneceu sob agitação (em vórtex) durante 30 min sendo, posteriormente, mantida em repouso durante 20 horas. Após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de água e gelo ao sistema. A solução foi neutralizada com ácido acético e a amostra metilada foi extraída com clorofórmio. A fase clorofórmica foi evaporada e o material metilado foi pré-hidrolisado com H_2SO_4 50% (v/v; 0,5 ml) por 1 h em banho de gelo, seguido pela diluição a 5,5% (v/v; adição de 4,0 ml de água destilada) e aquecimento a 100 °C por 16 h (SAEMAN et al., 1954). Após hidrólise, as soluções foram neutralizadas com BaCO_3 , reduzidas com NaB^2H_4 e acetiladas. Os alditóis acetatos parcialmente metilados foram analisados por GC-MS e identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa (SASSAKI et al., 2005).

3.5.4 Métodos analíticos

3.5.4.1 Cromatografia de partição em papel

Cromatografias de partição em papel foram realizadas para verificar a composição monossacarídica e detectar a presença de ácidos urônicos, aldobiurônicos e oligossacarídeos naturais presentes nas gomas. Esta metodologia foi também utilizada para purificar os oligossacarídeos ácidos produzidos por hidrólise ácida parcial no PPNA, conforme descrito no item 3.3.3. As cromatografias foram desenvolvidas pelo método descendente utilizando papel filtro Whatman 1MM (para as cromatografias analíticas) ou 3MM (para as cromatografias preparativas), solvente *n*-butanol:piridina:água 5:3:3 ou 1:1:1 (v/v) e reveladas com nitrato de prata (AgNO_3 saturada em acetona 1:1000 v/v) e hidróxido de sódio (NaOH 40% m/v em etanol 1:250 v/v) (TREVELYAN; PROCTER; HARRISON, 1950).

3.5.4.2 Cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS)

Os componentes monossacarídicos foram quantificados através de cromatógrafo gasoso Varian, modelo 3800, acoplado a espectrômetro de massa Saturn 2000R (GC-MS) utilizando coluna DB-225 (30 m x 0,25 mm). Durante a injeção da amostra a temperatura foi de 50 °C sendo então programada para aumentar 40 °C.min⁻¹ até atingir a temperatura constante de 220 °C (para análise de alditol acetato) ou 215 °C (para análise de alditol acetato parcialmente metilado). Hélio foi usado como gás de arraste. Algumas frações foram analisadas em cromatógrafo gasoso TRACE GC ULTRA (Thermo Electron Corporation) (GC), coluna capilar DB-225, com detector por ionização de chama (FID) e temperaturas de 250 e 300 °C para o injetor e o detector, respectivamente.

3.5.4.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN- ^{13}C , ^{13}C -DEPT-135, RMN- ^1H , HMQC, COSY e TOCSY foram adquiridos em aparelho BRUKER 400 MHz, modelo DRX Avance, a 50, 60 ou 70 °C, com ressonância em 100,24 MHz (para ^{13}C) e 400,13 MHz (para ^1H). As amostras foram solubilizadas em D_2O ou $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ ppm, baseando-se no padrão interno de acetona (δ 30,0 e δ 2,224 no ^{13}C e ^1H , respectivamente).

3.5.4.4 “Electrospray-ionisation mass spectrometry” (ESI-MS) dos oligossacarídeos

As análises de ESI-MS foram realizadas em equipamento Quattro Ultima, no modo negativo, utilizando um injetor manual (10 μl de volume) com um fluxo de 20 $\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$. As amostras foram previamente dissolvidas em H_2O miliQ ($\sim 100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e ultrafiltradas em membranas com porosidade igual a 0,22 μm .

3.5.5 Métodos colorimétricos

3.5.5.1 Dosagem de açúcar total

A dosagem de açúcar total foi feita pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). O princípio desta técnica baseia-se na ação do ácido sulfúrico sobre o açúcar, que perde duas moléculas de água para formar o derivado hidroximetilfurfural (para as hexoses) ou furfural (para as pentoses). Estes reagem com o fenol formando uma coloração que é medida em 490 nm. A sensibilidade do método é de 8 a 70 μg de carboidrato.

3.5.5.2 Dosagem de ácidos urônicos

A dosagem de ácido urônico foi realizada pelo método descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Em 400 µl de amostra foram adicionados 40 µl de solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6). A mistura foi aquecida em "banho maria" fervente por 20 min. Após resfriamento, 80 µl de *m*-hidroxibifenil (0,15% m/v em NaOH 0,5% m/v) foram adicionados e a coloração, estável até 1 hora após sua formação, foi lida em 525 nm. A sensibilidade do método é de 0,97 a 38,8 µg de ácido urônico. Ácido glucurônico foi utilizado como padrão.

3.5.5.3 Dosagem de proteínas

3.5.5.3 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de Hartree (1972). Em 1 ml de amostra foi adicionado 0,9 ml do reagente A (2 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 100 g de Na₂CO₃ em 500 ml de NaOH 1M são dissolvidos em 1000 ml de água destilada q.s.p.). A solução permaneceu em "banho-maria" a 50 °C durante 10 min. Em seguida ela foi resfriada até temperatura ambiente e adicionou-se 0,1 ml do reagente B (2 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 1 g de CuSO₄.5H₂O dissolvidos em 90 ml de água destilada, sobre os quais se adicionam 10 ml de NaOH 1M), permanecendo 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 3 ml do reagente C (1 ml de reagente de Folin Ciocalteau 2 N diluído em 15 ml de água destilada, sendo o volume final 16 ml), e a solução permaneceu em banho-maria a 50 °C durante 10 min e em seguida foi resfriada à temperatura ambiente. A sensibilidade do método é de 10-100 µg de proteína, e a coloração é lida em 650 nm. Soroalbumina bovina (SIGMA) foi utilizada como padrão.

3.6 ANÁLISES REOLÓGICAS - GOMA DO TRONCO DO PESSEGUEIRO

As análises reológicas foram desenvolvidas com a colaboração e supervisão das professoras Dr.^a Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz e Dr.^a Joana Lea Meira Silveira, do Laboratório de Carboidratos Vegetais, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFPR).

3.6.1 Solubilização e fracionamento da goma

Para analisar a viscosidade e outros aspectos reológicos da goma do pessegueiro, a goma bruta passou por um processo de extração muito semelhante àquele apresentado na Figura 8. A goma bruta (95 g) foi extraída com água (3 % m/v), sob agitação mecânica, a temperatura ambiente (~20 °C), durante 5 horas. A mistura foi filtrada em tecido fino e o resíduo obtido foi novamente submetido à extração aquosa, nas mesmas condições, porém durante 16 horas. Decorrido este tempo, a dispersão formada foi filtrada obtendo-se um extrato (EA - 60g – 63% de rendimento em relação à goma bruta) e um resíduo, denominado de gel retido (GR - 32g – 34% de rendimento em relação à goma bruta). As duas frações foram liofilizadas para realização das análises, procedimento este que não influenciou nas características físico-químicas dos géis formados. O polissacarídeo obtido por precipitação etanólica do extrato aquoso, que corresponde ao PPN, foi denominado de “POLI” e também foi analisado. A Figura 12 mostra esquematicamente o método de obtenção destas frações. Na Figura 13, pode-se observar o aspecto visual das mesmas, mais homogêneo e solúvel para as frações EA e POLI, com grumos de gel e um aspecto mais heterogêneo, no caso da dispersão que compõe a fração GR.

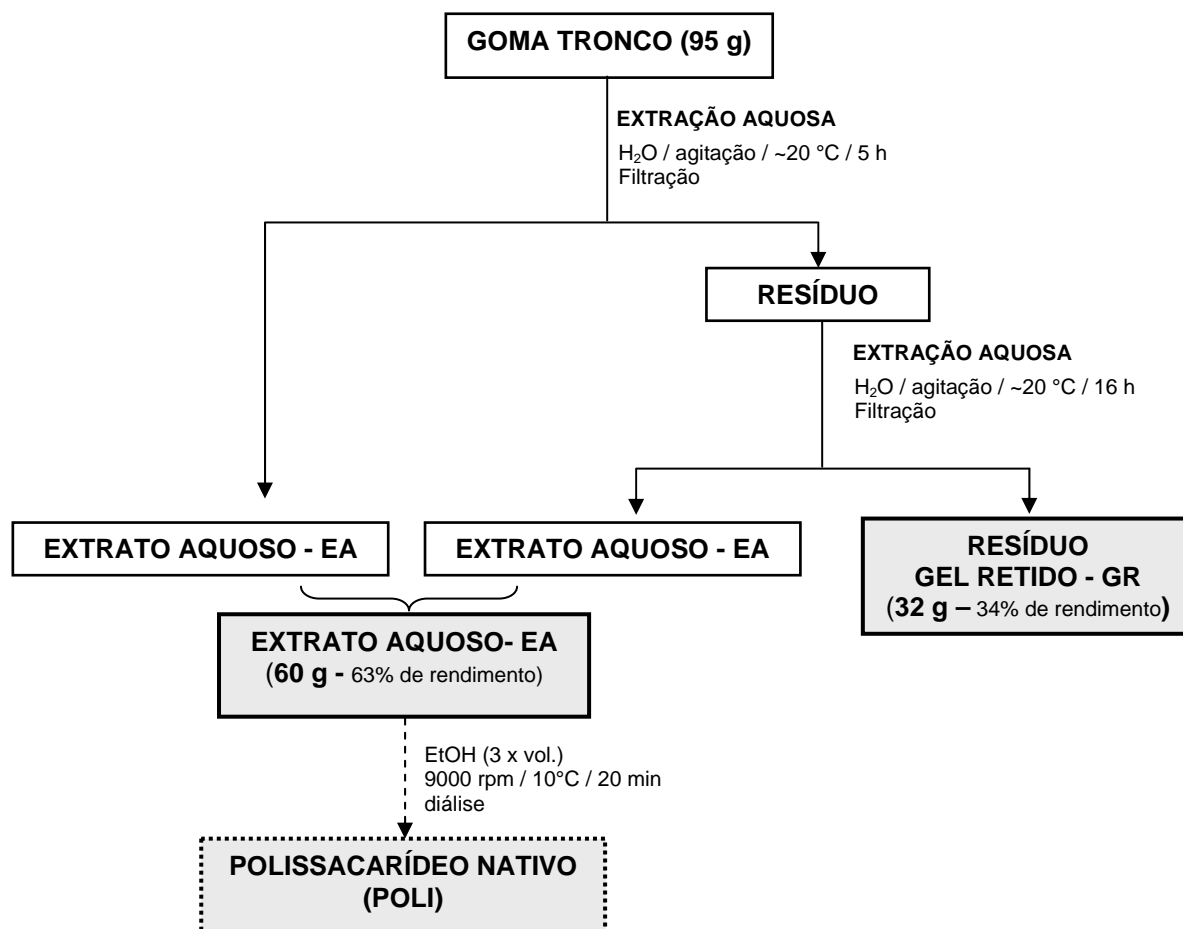


FIGURA 12 - MÉTODO DE FRACIONAMENTO DA GOMA DO PESSEGUEIRO PARA REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES REOLÓGICAS

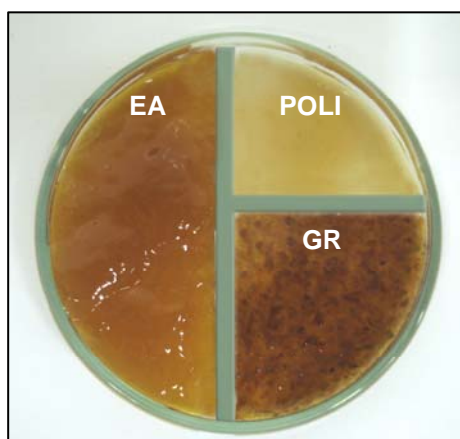


FIGURA 13 - ASPECTO VISUAL DAS FRAÇÕES EA, GR E POLI SOLUBILIZADAS EM ÁGUA A 4 % (m/v)

3.6.2 Análise da viscosidade intrínseca do extrato aquoso da goma (EA)

A viscosidade intrínseca é um parâmetro físico-químico que permite avaliar o volume hidrodinâmico de uma molécula em solução (SCHRAMM, 2006). A medida utilizada para o cálculo da viscosidade intrínseca foi o tempo de escoamento, em segundos, do solvente e da amostra, em diferentes concentrações, em viscosímetro capilar do tipo Ubbelohde. As análises foram realizadas a 22 °C. A fração EA foi solubilizada nas concentrações 0,04, 0,05, 0,06 e 0,08 g.dl⁻¹ em KCl 0,5M, permanecendo sob agitação magnética durante 24 horas antes da análise. Outros solventes também foram testados (H₂O, NaCl 0,01M, NaCl 0,1M, NaCl 0,3M, NaCl 1M), porém, com KCl 0,5M, foi obtido um menor valor da constante de Huggins ($K_H = 0,80$), o que indica ausência de interações intermoleculares (LAPASIN e PRICL, 1995) e, desta forma, permite um cálculo mais correto da viscosidade intrínseca. A equação de Huggins foi utilizada para a determinação da viscosidade intrínseca:

$$\eta_{\text{red}} = K_H [\eta]^2 C + [\eta]$$

Onde η_{red} é viscosidade reduzida (η_{sp}/C), K_H é a constante de Huggins, $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca e C é a concentração da amostra (g.dl⁻¹). Esta equação descreve uma reta onde, para cada concentração analisada, calcula-se o valor da viscosidade reduzida. O valor da viscosidade reduzida quando a concentração tende a zero fornece o valor de viscosidade intrínseca.

Tanto para o solvente como para cada solução de EA, em diferentes concentrações, cinco medidas de tempo de escoamento foram realizadas e a média foi calculada. Posteriormente, foram calculadas a viscosidade relativa ($\eta_{\text{rel}} = \text{tempo de escoamento da amostra} / \text{tempo de escoamento do solvente}$), a viscosidade específica ($\eta_{\text{sp}} = \text{viscosidade relativa} - 1$) e a viscosidade reduzida ($\eta_{\text{red}} = \text{viscosidade específica} / \text{concentração}$). Tendo a viscosidade reduzida, o gráfico que representa a equação de Huggins ($\eta_{\text{red}} \times C$) foi plotado, sendo o coeficiente linear

correspondente à viscosidade intrínseca da amostra. Este experimento foi realizado em triplicata.

3.6.3 Análises de comportamento de fluxo e dinâmico-oscilatórias

As curvas de viscosidade e os experimentos dinâmico-oscilatórios (varreduras de frequência e rampas de temperatura) foram realizados em reômetro HAAKE, modelo RS 75, utilizando o sistema PELTIER para controle de temperatura e o sensor placa-placa PP35-Ti. As frações GR (gel retido), EA (extrato aquoso) e POLI (polissacarídeo) foram solubilizadas em água, na concentração 4 % (m/v), sob agitação magnética durante 18 horas à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as soluções permaneciam em repouso durante ~30 minutos antes de serem analisadas. Para as três amostras, foram realizadas curvas de viscosidade, varreduras de tensão e de frequência. Com as frações EA e GR, também foram realizadas rampas de temperatura. Soluções salinas de NaCl 0,1M, KCl 0,1 e 0,5M e CaCl_2 0,1M também foram utilizadas para a solubilização de EA, e para estas amostras também foram realizadas curvas de viscosidade e varreduras de tensão e de frequência.

Os experimentos foram realizados a 25 °C. Nas curvas de viscosidade, a taxa de cisalhamento variou de 0 – 500 s^{-1} . As varreduras de tensão (0,01 – 50 Pa) foram realizadas em frequência fixa de 1 Hz. As varreduras de frequência (0,01 - 10 Hz) foram realizadas a 25° C com tensão fixa correspondente à região viscoelástica linear, que foi determinada para cada amostra a partir da varredura de tensão. Rampas de temperatura foram feitas na faixa de 5 – 95 °C e 95 – 5°C, com aquecimento na taxa de 1° C / minuto. Para este experimento, foi fixada a tensão correspondente à região viscoelástica linear e a frequência de 1 Hz. Após atingir a posição de medida, óleo mineral foi adicionado às bordas do sensor com o intuito de evitar a evaporação do solvente durante o processo de aquecimento das amostras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE QUÍMICA E ESTRUTURAL DAS GOMAS DO PESSEGUEIRO

4.1.1 Polissacarídeos nativos da goma do tronco (PPN e PPNA) e da goma do fruto (PPF e PPFA)

Os polissacarídeos nativos obtidos após extrações aquosas e alcalinas das gomas do tronco (PPN e PPNA, respectivamente) e do fruto (PPNF e PPNFA, respectivamente) foram analisados comparativamente quanto ao rendimento, composição monossacarídica e RMN-¹³C. PPN e PPNA, PPNF e PPNFA foram obtidos com rendimento de 38% e 42% (em relação ao peso seco da goma), 9% e 6% (em relação ao peso úmido da goma), respectivamente. Com relação à composição monossacarídica, PPN e PPNA apresentaram, ambos, arabinose, xilose, manose, galactose e ácido urônico na proporção de 36:7:2:42:13, além de traços de ramnose (Tabela 2). PPNF e PPNFA apresentaram os mesmos constituintes de PPN, na proporção de 32:13:2:33:20 e 32:14:2:34:18 (Tabela 2), respectivamente, além de traços de ramnose. A presença de arabinose e galactose como constituintes monossacarídicos majoritários sugere a presença de arabinogalactanas nas gomas de exsudatos tanto do tronco como do fruto.

Devido à presença de ácidos urônicos, o polissacarídeo nativo PPNA foi submetido ao procedimento de carboxi-redução com o intuito de transformar os ácidos urônicos nele presentes nos açúcares neutros correspondentes e, assim, identificar o(s) tipo(s) de ácido(s) urônico(s) presente(s) nesta amostra. Analisando a composição monossacarídica do polissacarídeo carboxi-reduzido PPNA-CR (Tabela 2) verificou-se a presença de Glc e 4-Me-Glc (proporção 2,5:1), monossacarídeos estes que não ocorriam no polissacarídeo nativo, indicando que ácido glucurônico e ácido 4-Me-glucurônico são os constituintes ácidos do PPNA. A presença de GlcA e 4-Me-GlcA na goma do tronco do pessegueiro tinha sido detectada por Jones, J. K. N. (1950), porém, em sua análise, a proporção entre os dois constituintes era de 1:1.

A análise comparativa entre PPN, PPNA, PPNF e PPNFA também foi realizada por RMN-¹³C (Figura 14), onde foi confirmada a alta similaridade entre a goma do tronco e a goma do fruto e entre os polissacarídeos extraídos com água e com álcali. Desta maneira, as frações de maior rendimento, PPNA e PPNF, foram escolhidas para realização das análises subseqüentes dos polissacarídeos nativos.

TABELA 2 - ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS (PPN, PPNA, PPNF E PPNFA) E DO POLISSACARÍDEO CARBOXI-REDUZIDO PPNA-CR

Polissacarídeo	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (%) ^a							
	Rha	Ara	Xyl	Man	4-Me-Glc	Gal	Glc	Ácido urônico ^b
PPN	tr.	36	7	2	-	42	-	13
PPNA	tr.	36	7	2	-	42	-	13
PPNA-CR ^c	tr.	34	10	4	2	42	5	3
PPNF	tr.	32	13	2	-	33	-	20
PPNFA	tr.	32	14	2	-	34	-	18

^a Percentual relativo de monossacarídeos; ^b dosado pelo método de Filizetti-Cozzi e Carpita, 1991;

^c PPNA carboxi-reduzido pelo método de Taylor e Conrad, 1972; tr. traços ($\leq 1\%$)

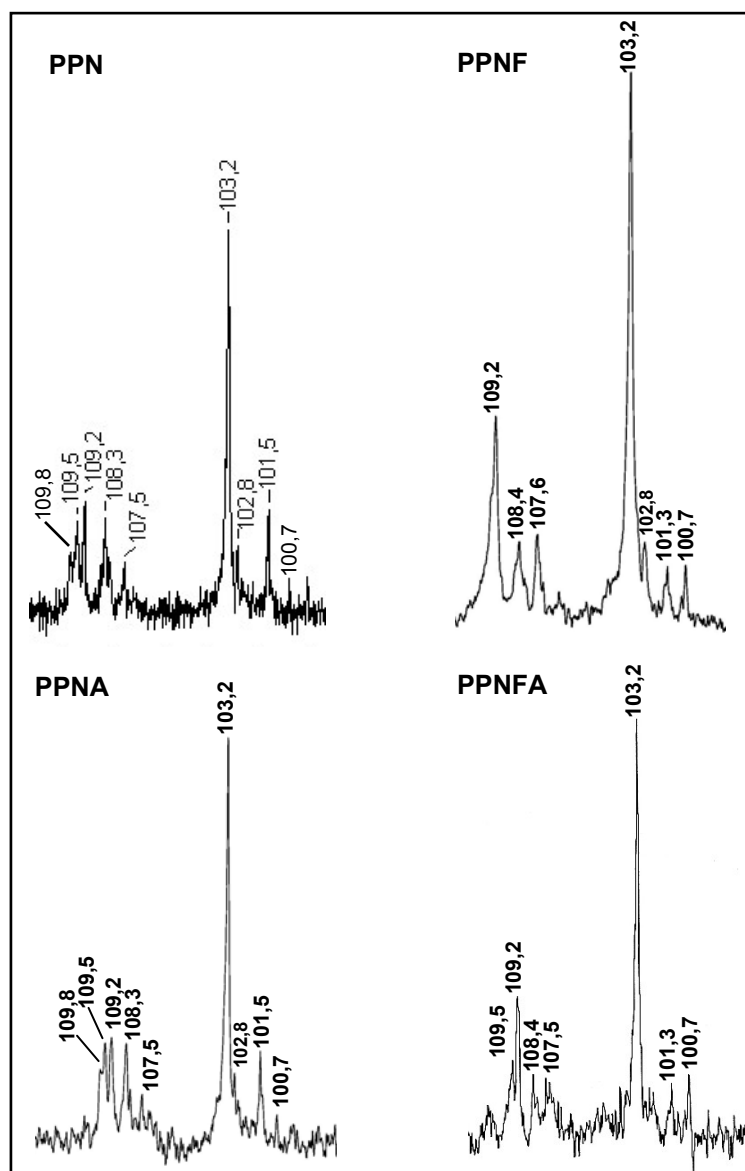


FIGURA 14 - REGIÕES DE CARBONO ANOMÉRICO (C-1) DOS ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DOS POLISSACARÍDEOS PPN, PPNF, PPNA E PPNFA
Solvente D_2O a 60 °C. Deslocamentos químicos expressos em δ (ppm)

Os polissacarídeos PPNA e PPNF foram analisados quanto à homogeneidade e massa molar, por HPSEC-MALLS (Figura 15), apresentando ambos perfis homogêneos. As massas molares médias ponderais em massa (M_w) encontradas para PPNA e PPNF foram $5,61 \times 10^6$ e $6,43 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, respectivamente, utilizando-se dn/dc igual a 0,143 e 0,135, respectivamente. Esses valores de massa são altos quando comparados com as massas molares de polissacarídeos encontrados em outras gomas de exsudatos como a goma arábica ($3,8 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$) (DEFAYE e WONG, 1986), do Angico Branco ($1,0 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$)

(DELGOBO *et al.*, 1998) e de cajueiro ($1,1 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$) (MENESTRINA *et al.*, 1998). A massa molar do polissacarídeo da goma do pessegueiro, calculada pelo método de sedimentação em ultracentrifugação, foi igual a $1,1 \times 10^6$ (ROSÍK *et al.*, 1966).

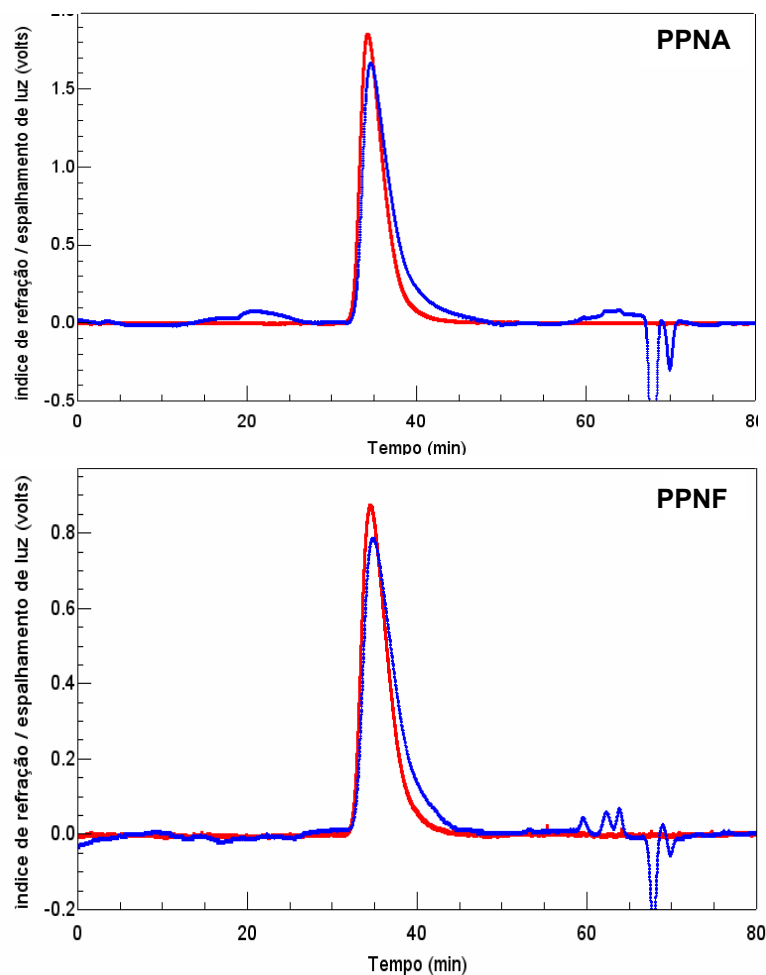


FIGURA 15 - PERFIS DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES PPNA E PPNF POR HPSEC-MALLS UTILIZANDO OS DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (VERMELHO) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (AZUL)

O polissacarídeo PPNA apresentou 1 % de proteínas, resultado este semelhante ao encontrado na literatura para outras gomas que apresentam arabinogalactanas como constituintes, como a goma arábica, goma de angico branco e do cajueiro, que apresentaram 2 % (ELMANAN *et al.*, 2007), 0,5 % (DELGOBO *et al.*, 1998) e 1 % (PEREIRA-NETTO *et al.*, 2007), respectivamente.

A análise de metilação (Tabela 3) do polissacarídeo PPNA mostrou a presença de terminais não redutores de Araf (20%) e de Xylp (13%) e unidades de Araf 3-O- (6%) e Araf 5-O- e/ou Arap 4-O-substituídas (14%). As unidades de galactose apresentaram-se majoritariamente na forma 3,6-di-O- (19%) e 3,4,6-tri-O-substituídas (14%), além de pequenas quantidades na forma 3-O- (7%), 6-O- (1%), 2,3-di-O- (2%) e 3,4-di-O-substituídas (4%). Estes dados sugerem a presença de uma estrutura altamente ramificada com cadeia principal de galactose. Comparando os dados de metilação do PPNA com os do PPNF, observa-se que o PPNF possui uma estrutura praticamente igual à do PPNA, entretanto a maior quantidade do derivado 2,4-Me₂-Gal (26%) e a menor quantidade do derivado 2-Me-Gal (6%) indica que, no PPNF, as unidades de galactose encontram-se menos substituídas em O-4.

TABELA 3 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS PPNA E PPNF

Alditóis acetatos parcialmente O-metilados ^a	Tipo de ligação correspondente	Tr ^b	POLISSACARÍDEOS (%) ^c	
			PPNA	PPNF
2,3,5-Me ₃ -Ara	Araf-(1→	7:42	20	16
2,3,4-Me ₂ -Xyl	Xylp-(1→	8:07	13	16
2,5-Me ₂ -Ara	→3)-Araf-(1→	8:57	6	3
2,3-Me ₂ -Ara	→5)-Araf-(1→, →4)-Arap-(→	9:26	14	12
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Galp-(1→	9:31	-	3
2,4,6-Me ₃ -Gal	→3)-Galp-(1→	11:21	7	7
2,3,4-Me ₃ -Gal	→6)-Galp-(1→	12:46	1	4
4,6-Me ₂ -Gal	→2,3)-Galp-(1→	12:58	2	4
2,6-Me ₂ -Gal	→3,4)-Galp-(1→	13:19	4	3
2,4-Me ₂ -Gal	→3,6)-Galp-(1→	16:27	19	26
2-Me-Gal	→3,4,6)-Galp-(1→	18:29	14	6

^a Metilação realizada segundo CIUCANU e KEREK (1984). Após metilação, os derivados foram hidrolisados pelo método descrito por SAEMAN *et al.* (1954) (pré-hidrólise de 1 hora e hidrólise de 16 horas); ^b Tempo de retenção (min.) dos derivados em coluna DB-225; ^c Percentual relativo dos derivados metilados nos polissacarídeos

O espectro de RMN-¹³C do polissacarídeo PPNA (Figura 16 A) apresenta aproximadamente 8 sinais na região de carbono anomérico (δ 110 – 90). Os sinais em δ 109,8-107,5 podem ser atribuídos às unidades de α -L-Araf (DELGOBO *et al.*, 1999; SIMS e FURNEAUX, 2003). O sinal principal em δ 103,2 refere-se às unidades de β -D-Galp da cadeia principal (TISCHER; GORIN; IACOMINI, 2002) e o sinal em δ 102,8 pode sugerir a presença de β -D-GlcAp (TISCHER; GORIN; IACOMINI, 2002). Na região de carbono substituído, os sinais em δ 84,1 e em δ 82,0-82,5 referem-se ao C-3 das unidades de α -L-Araf e β -D-Galp 3-O-substituídas, respectivamente (DELGOBO *et al.*, 1999; GUTIÉRREZ *et al.*, 2005). A partir de dados da literatura, os sinais em δ 76,5, δ 75,7, δ 73,0 e δ 69,3 puderam ser atribuídos ao C-5, C-3, C-2 e C-4 não substituídos, respectivamente, das unidades de β -D-Galp (GORIN e MAZUREK, 1975; DELGOBO *et al.*, 1999). Os carbonos do tipo -CH₂ foram assinalados com base no espectro de RMN ¹³C-DEPT cujos sinais de tais carbonos

aparecem invertidos (Figura 16 A - detalhe). O sinal em δ 68,9 representa o C-6 substituído das unidades de galactose (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005) confirmando os dados de metilação que mostram grande parte das unidades da cadeia principal 6-O-ligada. Na região de δ 66-61, os sinais em δ 65,2 e δ 63,0 podem ser atribuídos, respectivamente, ao C-5 dos terminais não redutores de β -D-Xylp (SIMAS *et al.*, 2004) e de unidades de β -Arap (DELGOBO *et al.*, 1999). O sinal em δ 61,5 pode ser atribuído ao C-6 não substituído das unidades de β -D-Galp e ao C-5 das unidades de α -L-Araf (DELGOBO *et al.*, 1999). O sinal em δ 59,8, que não inverteu no espectro de DEPT, foi atribuído aos grupos $-\text{CH}_3$ das unidades de ácido 4-O-Me-glucurônico (SIMAS *et al.*, 2006) presentes no polissacarídeo PPNA.

Na região anomérica do espectro de HMQC do PPNA (Figura 17 A), existe um grupo de sinais que tipicamente caracterizam as unidades de α -L-Araf (C-1/H-1 - δ 109,2/5,287, δ 108,3/5,427, δ 107,5/5,110 e δ 107,2/5,227), sendo os sinais dos carbonos e dos prótons assinalados em campo baixo. Com base nos dados da literatura, sabe-se que as unidades Galp, Xylp e GlcAp se encontram na forma β , porém, apenas um sinal representativo com alto valor de C-1 e baixo valor de H-1 (δ 103,2/4,476) foi observado no HMQC. A anomericidade dos carbonos da região de C-1/H-1 foi confirmada através do experimento de HMQC acoplado (Figura 18). A constante de acoplamento ($J_{\text{C-1/H-1}}$) para o sinal δ 103,2/4,476 apresentou um valor igual a 161 Hz, caracterizando configuração β (PERLIN e CASU, 1969). O sinal em δ 101,5/5,123 ($J_{\text{C-1/H-1}} = 181$ Hz) e os sinais em δ 100,7/4,846 ($J_{\text{C-1/H-1}} = 174$ Hz) e δ 99,9/5,027 ($J_{\text{C-1/H-1}} = 173$ Hz) podem ser atribuídos às unidades de β -L-Arap e α -D-Manp, respectivamente (PERLIN e CASU, 1969).

Com relação ao PPNF, seus espectros de RMN- ^{13}C (Figura 16 B), HMQC (Figura 17 B) e TOCSY (Figura 19 B) apresentaram alta semelhança com os espectros do PPNA, concordando com as análises de composição monossacarídica (Tabela 2, p. 72) e de metilação (Tabela 3, p. 76).

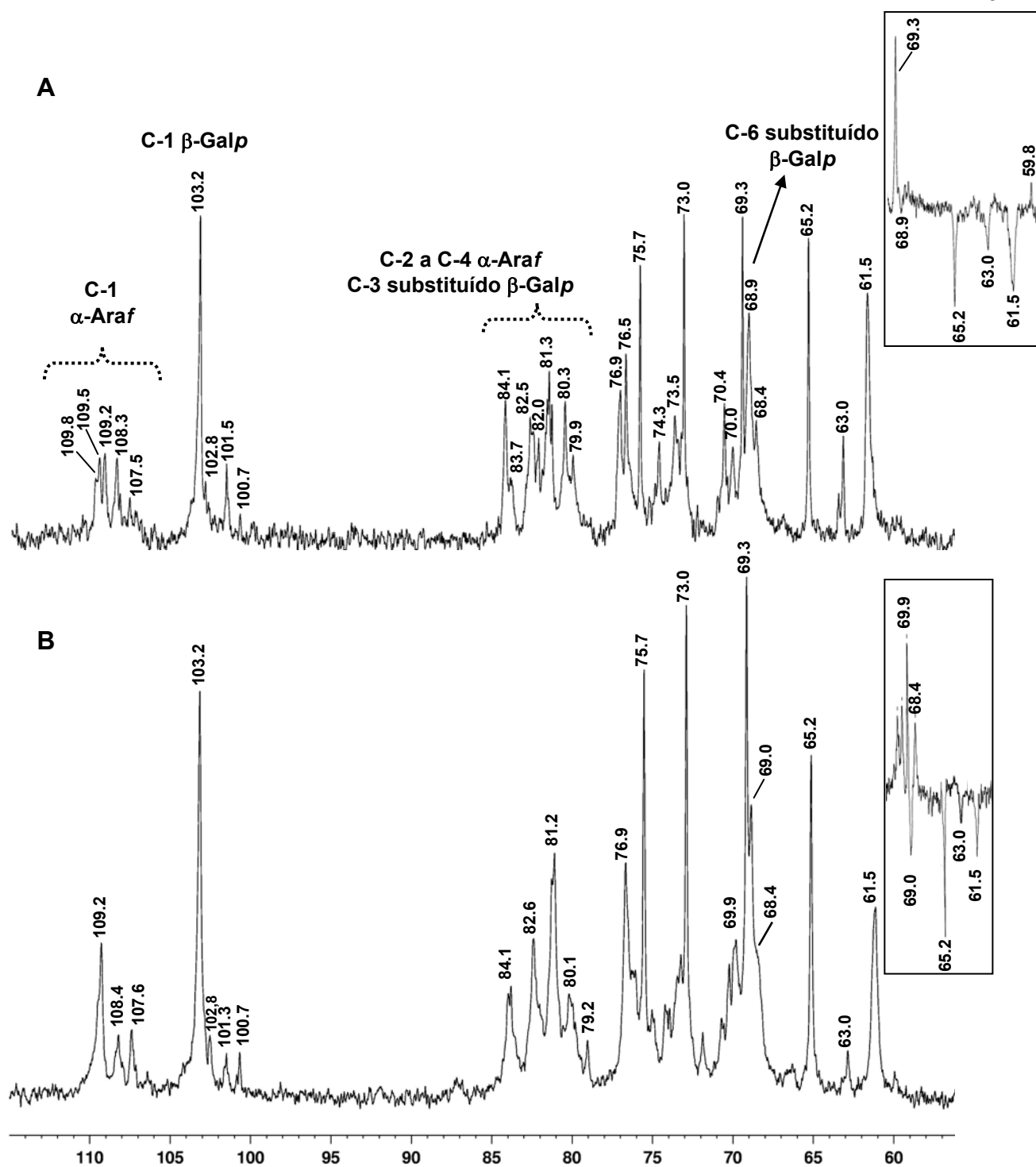


FIGURA 16 – ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES PPNA (A) E PPNF (B). EM DETALHE, REGIÕES DE $-\text{CH}_2$ DOS ESPECTROS DE ^{13}C -DEPT

Solvente: D_2O a 50°C . Deslocamentos químicos expressos em δ (ppm)

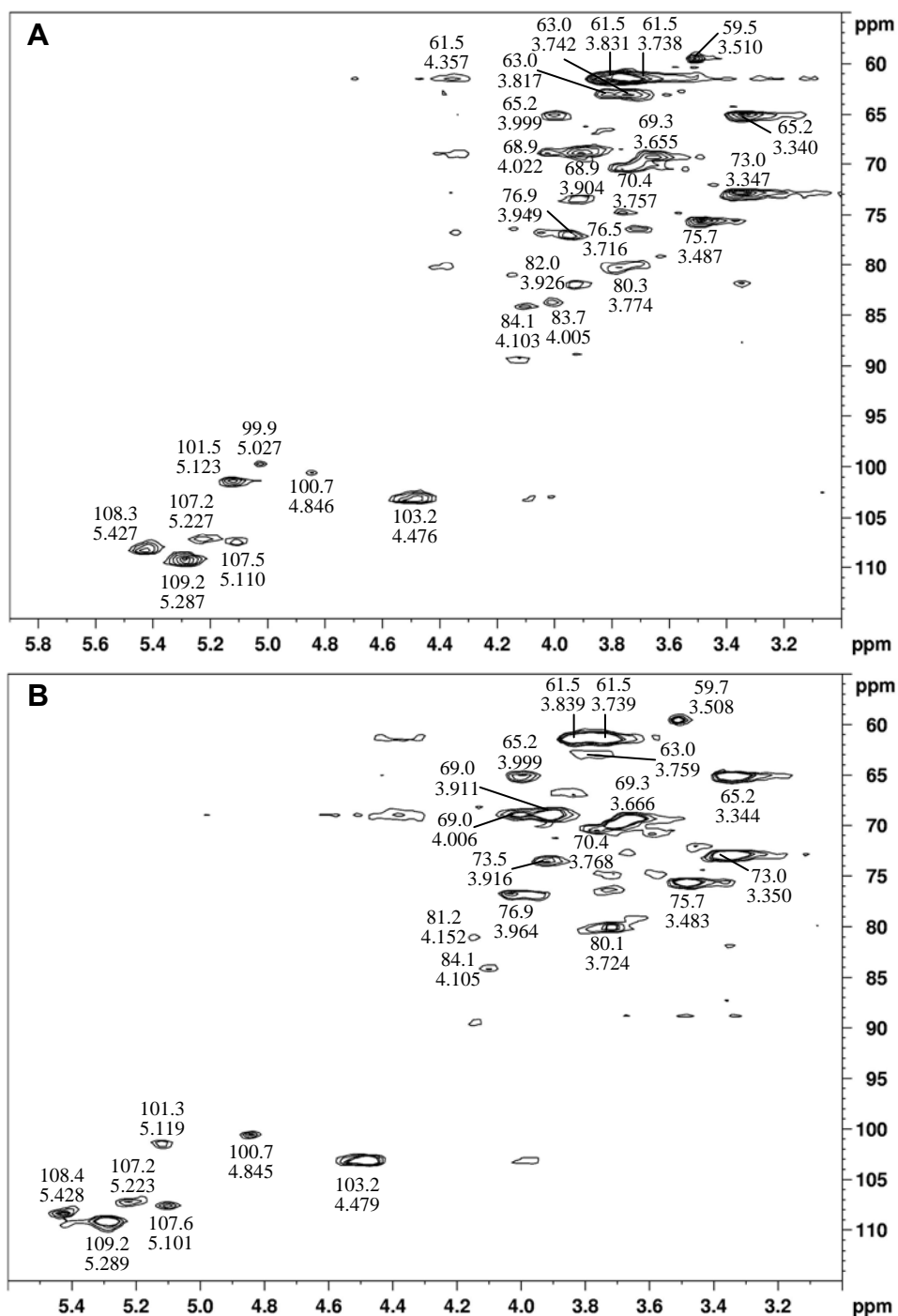


FIGURA 17 - ESPECTROS DE HMQC DAS FRAÇÕES PPNA (A) E PPNF (B)

Solvente: D₂O a 70 °C. Deslocamentos químicos expressos em δ (ppm)

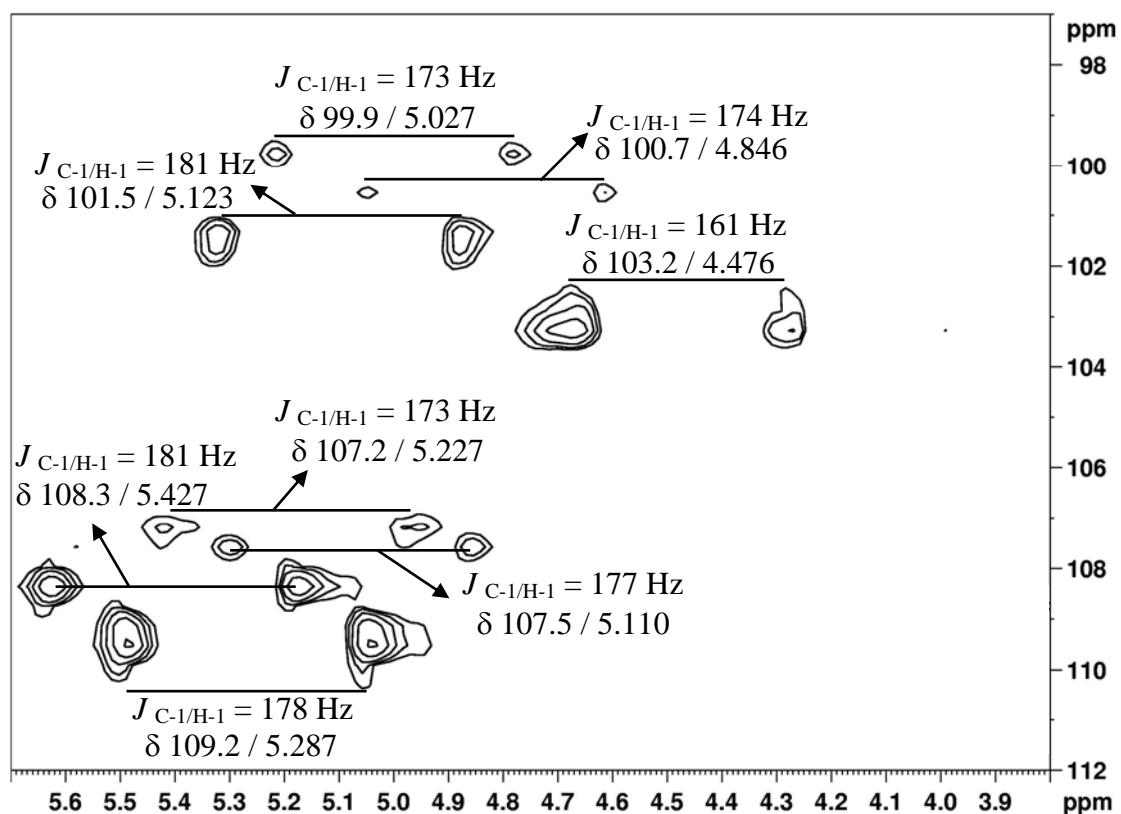


FIGURA 18 - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HMQC ACOPLADO DO PPNA

Solvente: D₂O a 70 °C. Deslocamentos químicos expressos em δ (ppm)

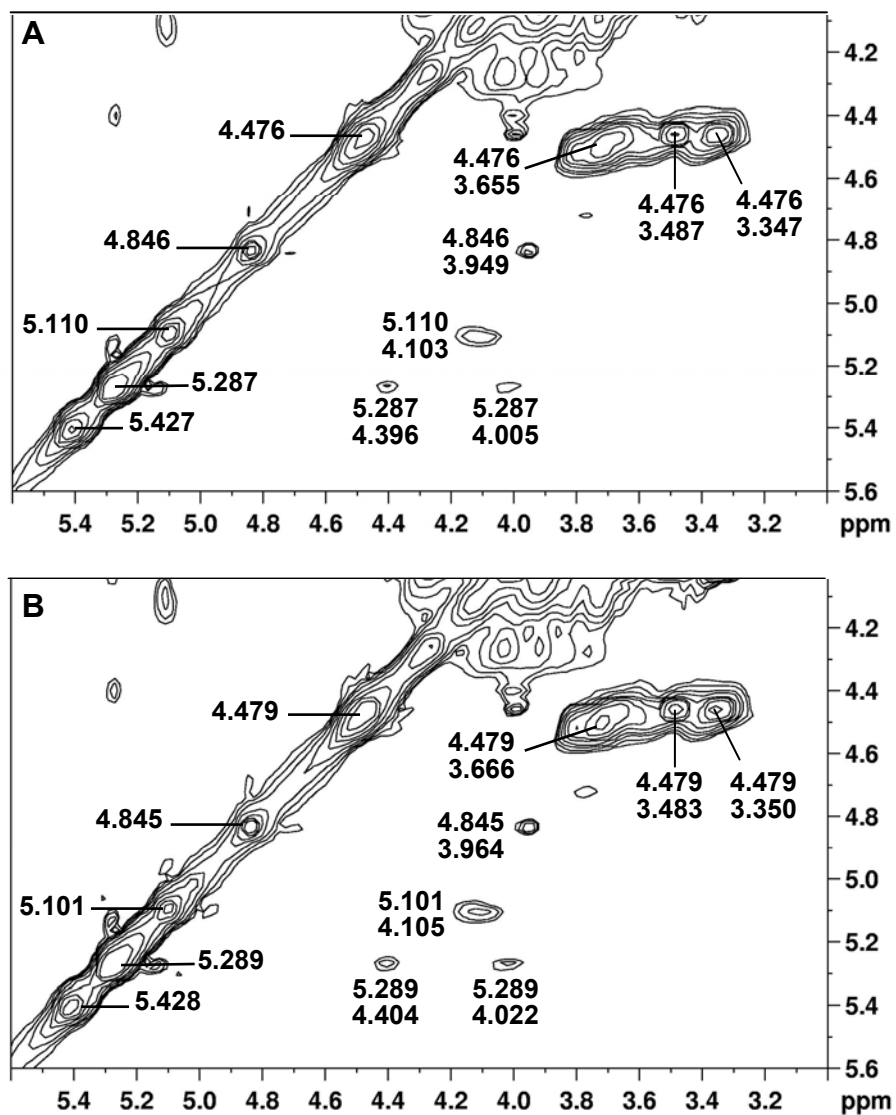


FIGURA 19 - CORRELAÇÕES DE H-1 NOS ESPECTROS DE TOCSY DAS FRAÇÕES PPNA (A) E PPNF (B)

Solvente: D₂O a 70 °C. Deslocamentos químicos expressos em δ (ppm)

4.1.2 Polissacarídeos produzidos por degradação controlada de Smith no PPNA (PPNAS e PPNAS2)

Um ciclo de degradação controlada de Smith no PPNA gerou um polissacarídeo, denominado de PPNAS (19 % de rendimento em relação ao PPNA), cuja análise por HPSEC, com detector de índice de refração (Figura 20), mostrou perfil polidisperso unimodal, sugerindo sua homogeneidade. O PPNAS apresentou-se composto por arabinose, manose, galactose e ácido urônico na proporção molar de 19:9:70:2 (Tabela 4). A composição monossacarídica do poliálcool (PPNA-O) (Tabela 4), resultante da oxidação do PPNA com periodato de sódio, também foi analisada, mostrando arabinose, manose e galactose na proporção de 20:6:74, composição esta semelhante à do PPNAS indicando que estes monossacarídeos eram resistentes à oxidação com periodato.

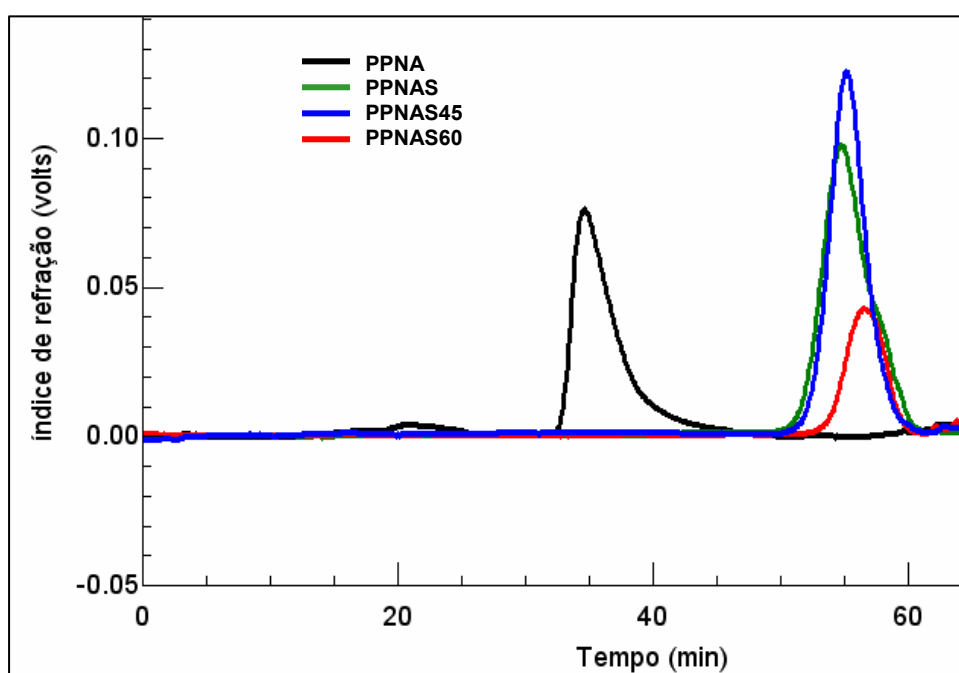


FIGURA 20 - PERFIL DE ELUIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS PPNA, PPNAS, PPNAS45 E PPNAS60 POR HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES PPNA, PPNAS, PPNA-O, PPNAS45, PPNAS60 E PPNAS2

Polissacarídeo	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (%) ^a				
	Ara	Xyl	Man	Gal	Ácido urônico ^b
PPNA	36	7	2	42	13
PPNAS	19	-	9	70	2
PPNA-O	20	-	6	74	nd
PPNAS45	13	-	10	75	2
PPNAS60	-	-	12	85	3
PPNAS2	-	-	29	71	-

^a Percentual relativo de monossacarídeos; ^b dosado pelo método de FILIZETTI-COZZI e CARPITA, 1991; nd: não determinado

Através da análise de metilação (Tabela 5) do PPNAS, verificou-se que o procedimento de degradação controlada de Smith eliminou as unidades de xilose e diminuiu consideravelmente as unidades de arabinose e ácido urônico no polissacarídeo. As unidades de arabinose ainda presentes como terminais não redutores (10%) são provenientes daquelas cadeias laterais 3-O-ligadas presentes no PPNA e que são resistentes à oxidação com NaIO_4 . O derivado 2,4,6-Me₃-Man (5%) corresponde às unidades de manose 3-O-substituídas que são resistentes à oxidação com NaIO_4 . Terminais não redutores de galactose são observados nesta amostra (2,3,4,6-Me₄-Gal / 10%), indicando a presença de unidades de galactose nas cadeias laterais do polissacarídeo nativo. Vale ressaltar o aumento de 7% para 16% do derivado correspondente às unidades de galactose 3-O-substituídas (2,4,6-Me₃-Gal) e, principalmente, o aumento em 30x do derivado 2,3,4-Me₃-Gal (31%) que corresponde à unidades de galactose 6-O-substituídas, o que indica que a cadeia principal do polissacarídeo é composta majoritariamente por Gal-(1→6)-ligada. Estes dados concordam com os trabalhos da literatura, que propõem uma cadeia principal (1→6) ligada e ramificada em O-3 por outras cadeias de Gal (1→3) e/ou (1→6) ligadas, além de outros açúcares (ROSÍK *et al.*, 1966; KARDOSOVÁ *et al.*, 1978 e 1979).

A análise de metilação do poliálcool PPNA-O (Tabela 5) concorda com os dados do PPNAS. O poliálcool PPNA-O apresenta 13% de unidades de Araf 3-O-ligadas, que, no PPNAS, aparecem na forma de terminais não redutores de Araf (10%). Além disso, os altos teores dos derivados 2,6-Me₂- (9%), 2,4-Me₂- (35%) e 2-Me-Gal (18%), no PPNA-O, aliado à grande proporção do derivado 2,3,4-Me₃-Gal (31%), correspondente a unidades de galactose 6-O-substituídas, no PPNAS sugere que as unidades de galactose da cadeia principal apresentam unidades sensíveis a oxidação com periodato especialmente em O-3 e O-4.

TABELA 5 - ANÁLISE DE METILAÇÃO COMPARATIVA DAS FRAÇÕES PPNA, PPNAS, PPNA-O, PPNAS45, PPNAS60 E PPNAS2

Alditóis acetatos parcialmente O-metilados ^a	Tipo de ligação correspondente	Tr. ^b	POLISSACARÍDEOS (%) ^c					
			PPNA	PPNAS	PPNA-O	PPNAS45	PPNAS60	PPNAS2
2,3,5-Me ₃ -Ara	Araf-(1→	7:42	20	10	-	5	-	-
2,3,4-Me ₂ -Xyl	Xylp-(1→	8:07	13	-	-	-	-	-
2,5-Me ₂ -Ara	→3)-Araf-(1→	8:57	6	-	13	-	-	-
2,3-Me ₂ -Ara	→5)-Araf-(1→, →4)-Arap-(→	9:26	14	-	-	-	-	-
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Galp-(1→	9:31	-	10	-	11	18	25
2,4,6-Me ₃ -Man	→3)-Manp-(1→	11:04	-	5	3	4	7	17
2,4,6-Me ₃ -Gal	→3)-Galp-(1→	11:21	7	16	12	17	15	32
3-Me-Ara	→2,5)-Araf-(1→, →2,4)-Arap-(1→	11:96	-	-	3	-	-	-
2,3,4-Me ₃ -Gal	→6)-Galp-(1→	12:46	1	31	-	34	45	2
4,6-Me ₂ -Gal	→2,3)-Galp-(1→	12:58	2	5	7	8	6	21
2,6-Me ₂ -Gal	→3,4)-Galp-(1→	13:19	4	-	9	-	-	-
2,4-Me ₂ -Gal	→3,6)-Galp-(1→	16:27	19	23	35	20	9	3
2-Me-Gal	→3,4,6)-Galp-(1→	18:29	14	-	18	-	-	-

^a Metilação realizada segundo CIUCANU e KEREK (1984). Após metilação, os derivados foram hidrolisados pelo método descrito por SAEMAN *et al.* (1954) (pré-hidrólise de 1 h e hidrólise de 16 h);

^b Tempo de retenção (min) dos derivados em coluna DB-225; ^c Percentual relativo dos derivados metilados nos polissacarídeos

O espectro de RMN- ^{13}C do PPNAS (Figura 21) mostra apenas 4 sinais na região anomérica, confirmando os dados de metilação. Na região anomérica, o sinal em $\delta 109,2$ é referente aos terminais não redutores de $\alpha\text{-L-Araf}$. Os sinais em $\delta 104,4$ e $\delta 103,7$ foram atribuídos aos terminais não redutores de $\beta\text{-Galp}$ e unidades de $\beta\text{-Galp}$ 3-O- e/ou 6-O-ligadas, respectivamente (GORIN e MAZUREK, 1975; TISCHER *et al.*, 2002). O sinal em $\delta 100,8$ pode ser atribuído às unidades de $\alpha\text{-D-Manp}$ 3-O-substituídas (WAGNER *et al.*, 2004). Em campo mais alto, os sinais em $\delta 68,1$, $\delta 61,8$, $\delta 60,7$ e $\delta 60,5$ inverteram no experimento de ^{13}C -DEPT (Figura 21-detalhe), caracterizando o C-6 substituído das unidades de $\beta\text{-D-Galp}$ da cadeia principal, C-5 das unidades de $\alpha\text{-L-Araf}$ e C-6 livre das unidades de $\beta\text{-D-Galp}$ e $\alpha\text{-D-Manp}$, respectivamente (DELGOBO *et al.*, 1999; SIMS e FURNEAUX, 2003; TISCHER *et al.*, 2002; MARTÍNEZ *et al.*, 2003).

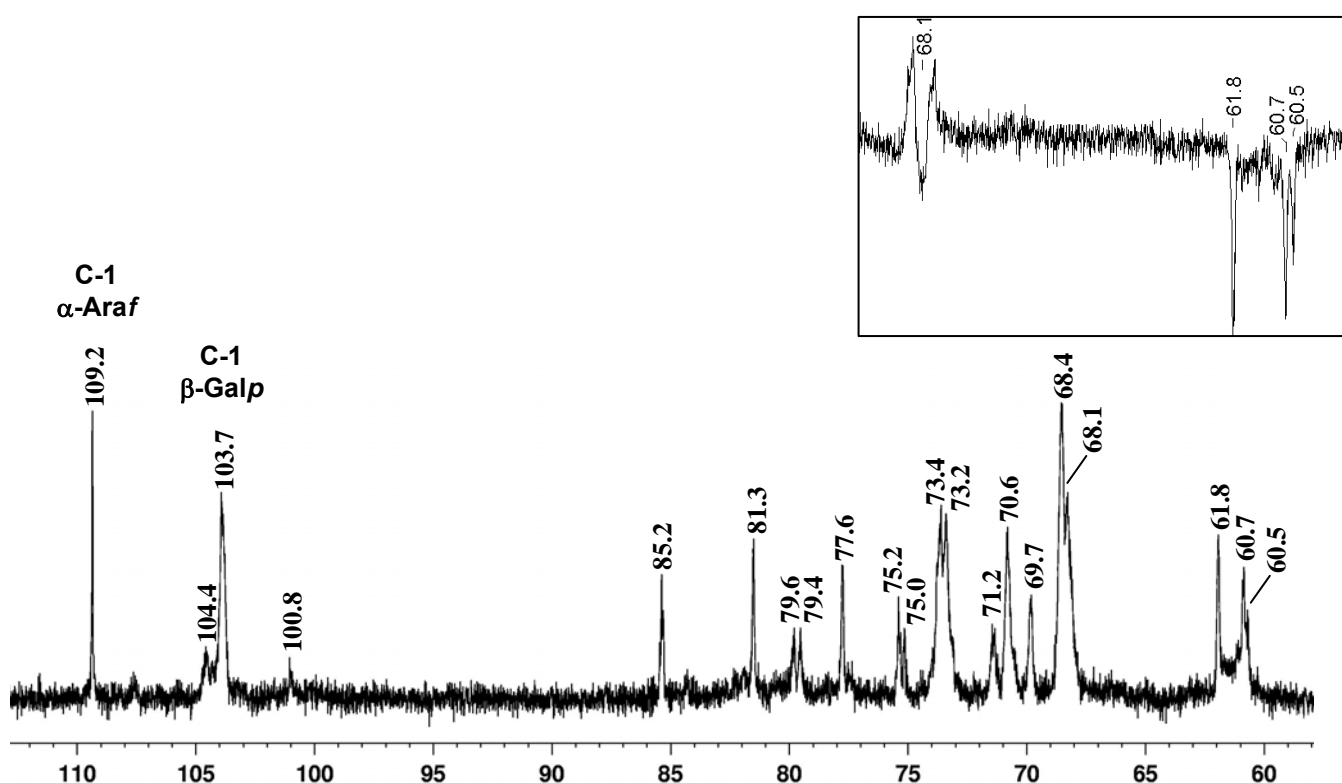


FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DO POLISSACARÍDEO DEGRADADO PPNAS. NO DETALHE: SINAIS INVERTIDOS NO ESPECTRO DE ^{13}C -DEPT

Solvente: D_2O a 60°C . Deslocamentos químicos são expressos em δ (ppm)

Em outro experimento, foram realizados dois ciclos consecutivos de degradação controlada de Smith no PPNA, dando origem ao polissacarídeo PPNAS2, com rendimento consideravelmente baixo (0,45%) uma vez que o PPNAS possuía grande quantidade de unidades de galactose (1→6) ligadas, susceptíveis à oxidação com periodato. O PPNAS2 apresentou galactose e manose como componentes monossacarídicos na proporção de 71:29 (Tabela 4, p. 84). Através da análise de metilação desta fração (Tabela 5, p. 85), observa-se a presença de terminais não redutores de Galp (25%) e de uma cadeia de Galp 3-O-ligada (32%) com algumas destas unidades substituídas em O-2 (21%) por cadeias laterais de Manp 3-O-ligadas (17%). Estes dados indicam que as cadeias de Manp e Galp (1→3)-ligadas não se encontram alternadas às cadeias de Galp (1→6)-ligadas da cadeia principal. A presença de unidades de manose (1→3)-ligadas ainda não havia sido descrita no polissacarídeo da goma do pessegueiro, sendo anteriormente identificada apenas na forma 2-O-ligada às unidades de ácido glucurônico (ROSÍK; KARDOSOVÁ; KUBALA, 1967).

Na região anomérica do espectro de RMN-¹³C do PPNAS2 (Figura 22), os sinais em δ 104,5-104,8 e δ 103,7 foram atribuídos aos terminais não redutores e unidades 3-O-substituídas de β -Galp, respectivamente (DELGOBO *et al.*, 1999; GORIN e MAZUREK, 1975), e os sinais em δ 99,2-100,6 às unidades de α -Manp (WAGNER *et al.*, 2004).

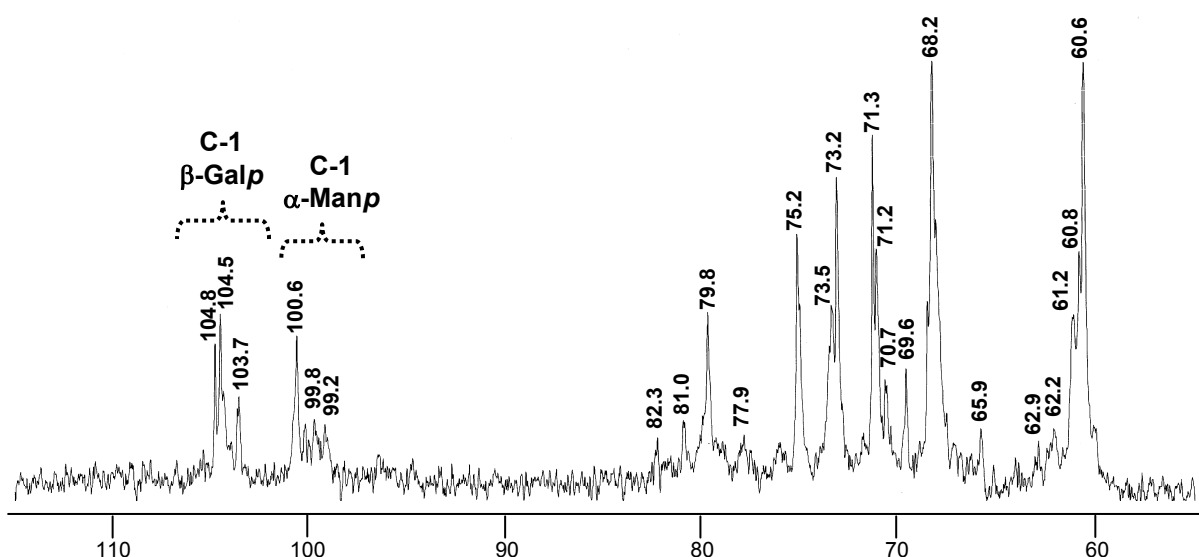


FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN-¹³C DO POLISSACARÍDEO PPNAS2

Solvente: Me₂SO-*d*₆ a 60° C. Deslocamentos químicos são expressos em δ (ppm)

4.1.3 Polissacarídeos obtidos após hidrólise ácida parcial no PPNAS (PPNAS45 e PPNAS60)

Uma vez que o polissacarídeo degradado, PPNAS, ainda apresentava uma estrutura ramificada, o procedimento de hidrólise ácida parcial foi realizado nesta fração com o objetivo de se aproximar ainda mais da cadeia principal do polissacarídeo nativo. PPNAS foi submetido à hidrólise ácida parcial com TFA 0,1M durante 45 e 60 minutos, produzindo as frações PPNAS45 (58% de rendimento em relação ao PPNAS) e PPNAS60 (20% de rendimento em relação ao PPNAS), respectivamente.

A fração PPNAS45 mostrou-se homogênea quando analisada pelo detector de índice de refração do HPSEC (Figura 20, p. 83) e composta por arabinose, manose, galactose e ácido urônico na proporção 13:10:75:2 (Tabela 4, p. 84). Os dados de metilação (Tabela 5, p. 85) mostraram que o tempo de 45 minutos não foi suficiente para gerar diferenças significativas na estrutura do PPNAS, sendo ainda presentes terminais não redutores de Araf (5%) e outros derivados com proporções muito semelhantes às encontradas para o PPNAS. O espectro de RMN-¹³C (não mostrado) de PPNAS45 confirma os dados de metilação, mostrando-se praticamente igual ao do PPNAS, apenas com o sinal de α -L-Araf menos intenso.

O polissacarídeo PPNAS60 apresentou-se homogêneo quando analisado pelo detector de índice de refração do HPSEC (Figura 20, p. 83), com M_w $1,26 \times 10^4$ g.mol⁻¹, e composto por manose, galactose e ácido urônico na proporção 12:85:3 (Tabela 4, p. 84). Os dados de metilação desta fração (Tabela 5, p. 85) mostraram a presença de uma estrutura mais simples, com um decréscimo significativo na quantidade de Galp 3,6-di-O-substituída (9%) e um concomitante aumento de Galp-6-O-substituída (45%), indicando a presença de uma cadeia principal com grande proporção de unidades de Galp-(1→6)-ligadas. Ainda na tabela de metilação (p. 85) pode-se destacar, no PPNAS60, a presença de 18% de terminais não redutores de Galp e de 7% de unidades de Manp-(1→3)-ligadas. O espectro de RMN-¹³C de PPNAS60 (Figura 23) possui um sinal principal em δ 103,6 atribuído às unidades de β -Galp mono- e di-substituídas. Os sinais menos intensos em δ 104,5 e δ 100,8-99,9 podem ser atribuídos aos terminais não redutores de β -Galp (GORIN e MAZUREK,

1975) e às unidades de α -Manp (WAGNER *et al.*, 2004), respectivamente. Os sinais em δ 75,1, δ 73,4, δ 70,4 e δ 68,3 podem ser atribuídos ao C-5, C-3, C-2 e C-4, respectivamente, das unidades de β -Galp da cadeia principal (GORIN e MAZUREK, 1975). Os sinais em δ 68,2 e δ 60,5 apareceram invertidos no espectro de ^{13}C -DEPT (Figura 23 - detalhe) caracterizando o C-6 substituído e não substituído, respectivamente, das unidades de β -Galp.

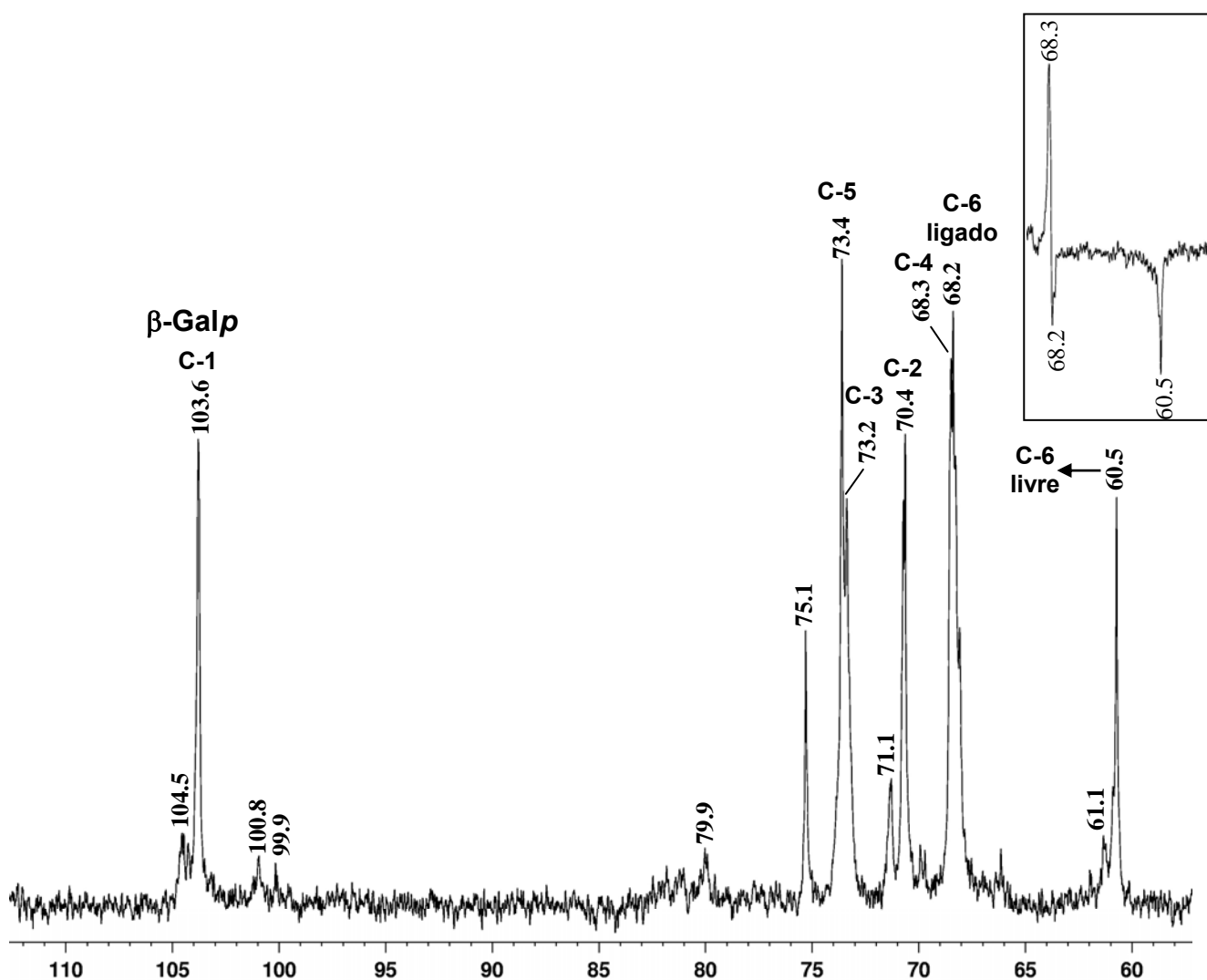


FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DO POLISSACARÍDEO PPNAS60. NO DETALHE: SINAIS INVERTIDOS NO ESPECTRO DE ^{13}C -DEPT Solvente: $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 60 °C. Deslocamentos químicos são expressos em δ (ppm). C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6: sinais referentes aos carbonos das unidades de β -Galp da cadeia principal

4.1.4 Oligossacarídeos produzidos por hidrólise ácida parcial do PPNA

Os oligossacarídeos isolados por cromatografia em papel preparativa apresentaram R_{Lact} de 0,3, 0,34 e 0,37 e foram denominados de oligo-0,3 (6 mg), oligo-0,34 (4 mg) e oligo-0,37 (6 mg), respectivamente. Quando analisados por ESI-MS (modo negativo) (Figura 24), os oligossacarídeos 0,3 e 0,37 geraram, majoritariamente, o íon molecular com m/z de 355,7, que corresponde à massa de um dissacarídeo composto por hexose e ácido urônico ($[M-1]^-$). O íon molecular com m/z de 337,3, observado no espectro do oligo-0,37, pode ser atribuído à massa do dissacarídeo composto por hexose e glucuronolactona ($[M-1]^-$), uma vez que, em condições ácidas, o ácido glucurônico pode sofrer desidratação intramolecular. O oligossacarídeo 0,34, por sua vez, gerou, majoritariamente, o íon molecular com m/z de 368,9 correspondente a um dissacarídeo composto por hexose e ácido urônico metilado ($[M-1]^-$). Com relação à composição monossacarídica, galactose foi o componente majoritário dos oligossacarídeos 0,3 e 0,34 e manose o componente majoritário do oligossacarídeo 0,37.

Através da análise conjunta do ESI-MS, da composição monossacarídica e do espectro de RMN- ^{13}C (Figura 25 A), o oligo-0,3 foi caracterizado como sendo, majoritariamente, o dissacarídeo β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Gal. O espectro de RMN- ^{13}C do oligo-0,3 apresenta 4 sinais na região de carbono anomérico. Os sinais em δ 102,9 e δ 102,1 foram atribuídos ao C-1 do terminal não redutor de β -GlcpA quando ligado na β - (δ 96,9) e na α -Galp (δ 92,8) redutora e os sinais em δ 82,4 e δ 60,0 ao C-4 e ao grupo metil (DELGOBO *et al.*, 1998), respectivamente, das unidades de 4-Me-GlcpA do oligossacarídeo 4-Me- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- $\alpha\beta$ -D-Gal (oligo-0,34) também presente, em menor quantidade, nesta fração. No espectro de ^{13}C -DEPT do oligo-0,3 (não mostrado) o sinal em δ 70,0 inverteu, caracterizando o C-6 substituído das unidades redutoras de galactose.

O oligo-0,37 apresentou manose como principal componente e os resultados de ESI-MS e RMN- ^{13}C (Figura 25 B) permitiram sua caracterização como sendo o oligossacarídeo β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)- $\alpha\beta$ -D-Manp. Na região anomérica do RMN- ^{13}C , os sinais em δ 103,8, δ 101,7, δ 93,8 e δ 92,2 foram atribuídos aos terminais não redutores de β -GlcpA ligados à β -Manp, ligados à α -Manp, e às unidades de β - e

α -Manp redutoras, respectivamente. (WAGNER *et al.*, 2004). O sinal em δ 78,6 foi atribuído ao C-2 substituído das unidades de α -Manp (WAGNER *et al.*, 2004).

Os oligossacarídeos identificados e caracterizados neste trabalho vêm complementar as análises realizadas por Rosík, Kardosová e Kubala (1967), que também descreveram a presença destes oligossacarídeos aldobiurônicos após a hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo da goma do pessegueiro.

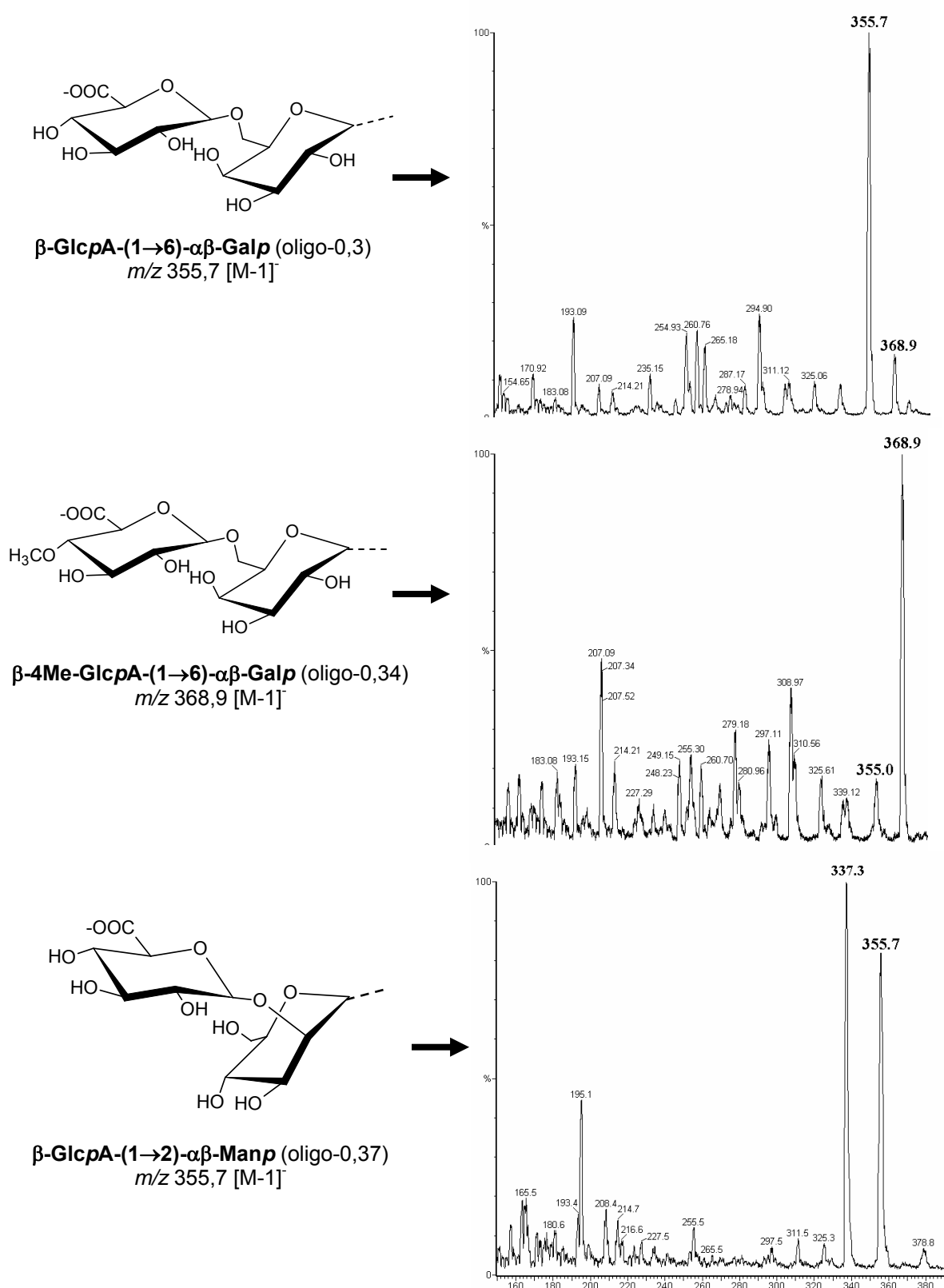


FIGURA 24 - ESI-MS (MODO NEGATIVO) DOS OLIGOSSACARÍDEOS OLIGO-0,3, OLIGO-0,34 E OLIGO-0,37

Amostras a $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, em H_2O Miliq, filtradas em membranas de $0,22 \mu\text{m}$

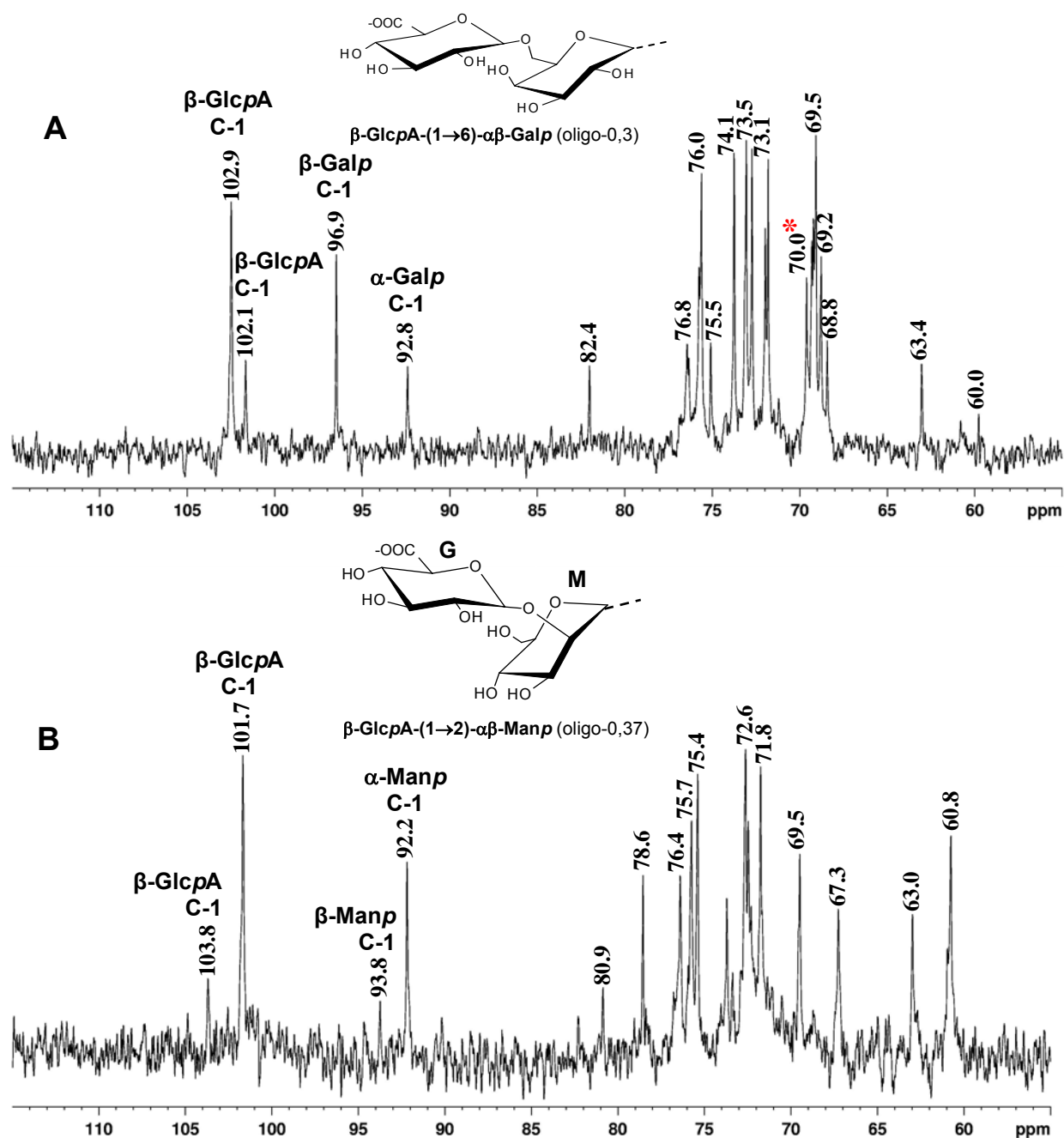


FIGURA 25 - ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DOS OLIGOSSACARÍDEOS OLIGO-0,3 (A) E OLIGO-0,37 (B). * SINAL INVERTIDO NO ESPECTRO DE ^{13}C -DEPT

Solvente: D_2O a 60 °C. Deslocamentos químicos são expressos em δ (ppm)

4.2 ANÁLISE ESTRUTURAL COMPARATIVA ENTRE AS GOMAS PRODUZIDAS PELOS TRONCOS DO PESSEGUEIRO E DA NECTARINEIRA

A nectarina é uma variedade (var. *nucipersica*) do gênero *Prunus persica*, produzida a partir de um cruzamento entre pessegueiros e ameixeiras. Desta forma, surgiu o interesse de verificar se a goma produzida pela nectarineira seria igual à goma produzida pelo pessegueiro.

O polissacarídeo nativo obtido após extração aquosa da goma da nectarineira (PPNEC) apresentou-se homogêneo quando analisado por HPSEC-MALLS (Figura 26) e com M_w igual a $3,93 \times 10^6$ g.mol⁻¹ (dn/dc de 0,151).

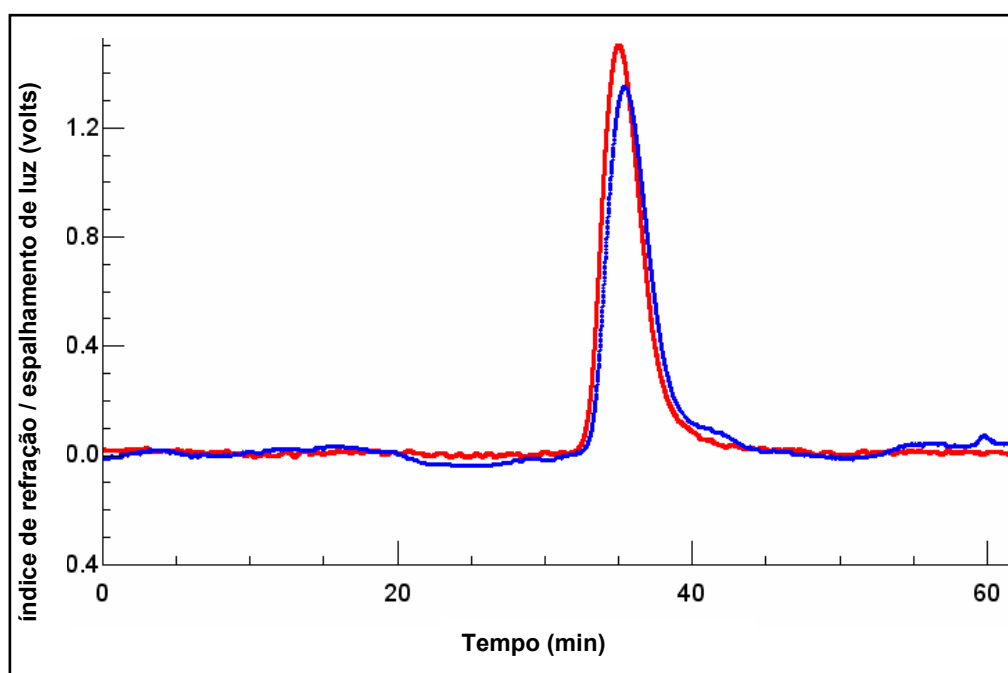


FIGURA 26 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO PPNEC POR HPSEC-MALLS UTILIZANDO OS DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (VERMELHO) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (AZUL)

Com relação à composição monossacarídica, PPNEC é muito semelhante ao PPNA, apresentando arabinose, xilose, manose, galactose e ácido urônico na proporção de 37:13:2:42:6, além de traços de ramnose (Tabela 6). Para identificar os monossacarídeos resistentes à oxidação com periodato, o poliálcool (PPNEC-O) resultante da oxidação do PPNEC, foi analisado quanto à composição monossacarídica apresentando arabinose, manose e galactose, na proporção 19:8:73 (Tabela 6), como componentes monossacarídicos. Este resultado é muito semelhante ao encontrado para o poliálcool proveniente do PPNA, denominado PPNA-O.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES PPNA, PPNA-O, PPNEC E PPNEC-O

Polissacarídeo	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (%) ^a					
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Ácido urônico ^b
PPNA	tr.	36	7	2	42	13
PPNA-O	-	20	-	6	74	nd.
PPNEC	tr.	37	13	2	42	6
PPNEC-O	-	19	-	8	73	nd.

^a Percentual relativo de monossacarídeos; ^b dosado pelo método de FILIZETTI-COZZI e CARPITA, 1991; nd: não determinado

A análise de metilação do PPNEC e do PPNEC-O (Tabela 7) mostra os mesmos derivados metilados, com pequenas diferenças quantitativas, encontrados para o PPNA e PPNA-O. O espectro de RMN-¹³C do PPNEC (Figura 27) é igual ao espectro do PPNA, confirmando os dados de metilação e indicando grande semelhança entre as estruturas. Estes resultados sugerem que diferentes variedades de *Prunus persica*, como é o caso do pessegueiro e da nectarineira, produzem gomas de exsudatos com polissacarídeos estruturalmente iguais. Entretanto, diferentes espécies do gênero *Prunus* produzem gomas com algumas diferenças estruturais (STEPHEN, 1983).

TABELA 7 - ANÁLISE DE METILAÇÃO COMPARATIVA DAS FRAÇÕES PPNA, PPNA-O, PPNEC E PPNEC-O

Alditóis acetatos parcialmente O-metilados ^a	Tipo de ligação correspondente	Tr ^b	Polissacarídeos (%) ^c			
			PPNA	PPNA-O	PPNEC	PPNEC-O
2,3,5-Me ₃ -Ara	Araf-(1→	7:42	20	-	26	-
2,3,4-Me ₂ -Xyl	Xylp-(1→	8:07	13	-	17	-
2,5-Me ₂ -Ara	→3)-Araf-(1→	8:57	6	13	7	11
2,3-Me ₂ -Ara	→5)-Araf-(1→, →4)-Arap-(→	9:26	14	-	19	-
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Galp-(1→	9:31	-	-	-	-
2,4,6-Me ₃ -Man	→3)-Manp-(1→	11:04	-	3	-	4
2,4,6-Me ₃ -Gal	→3)-Galp-(1→	11:21	7	12	4	10
3-Me-Ara	→2,5)-Araf-(1→, →2,4)-Arap-(1→	11:96	-	3	2	3
2,3,4-Me ₃ -Gal	→6)-Galp-(1→	12:46	1	-	-	-
4,6-Me ₂ -Gal	→2,3)-Galp-(1→	12:58	2	7	1	6
2,6-Me ₂ -Gal	→3,4)-Galp-(1→	13:19	4	9	3	10
2,4-Me ₂ -Gal	→3,6)-Galp-(1→	16:27	19	35	12	35
2-Me-Gal	→3,4,6)-Galp-(1→	18:29	14	18	9	21

^a Metilação realizada segundo CIUCANU e KEREK (1984). Após metilação, os derivados foram hidrolisados pelo método descrito por SAEMAN *et al.* (1954) (pré-hidrólise de 1 h e hidrólise de 16 h);

^b Tempo de retenção (min.) dos derivados em coluna DB-225; ^c Percentual relativo dos derivados metilados nos polissacarídeos

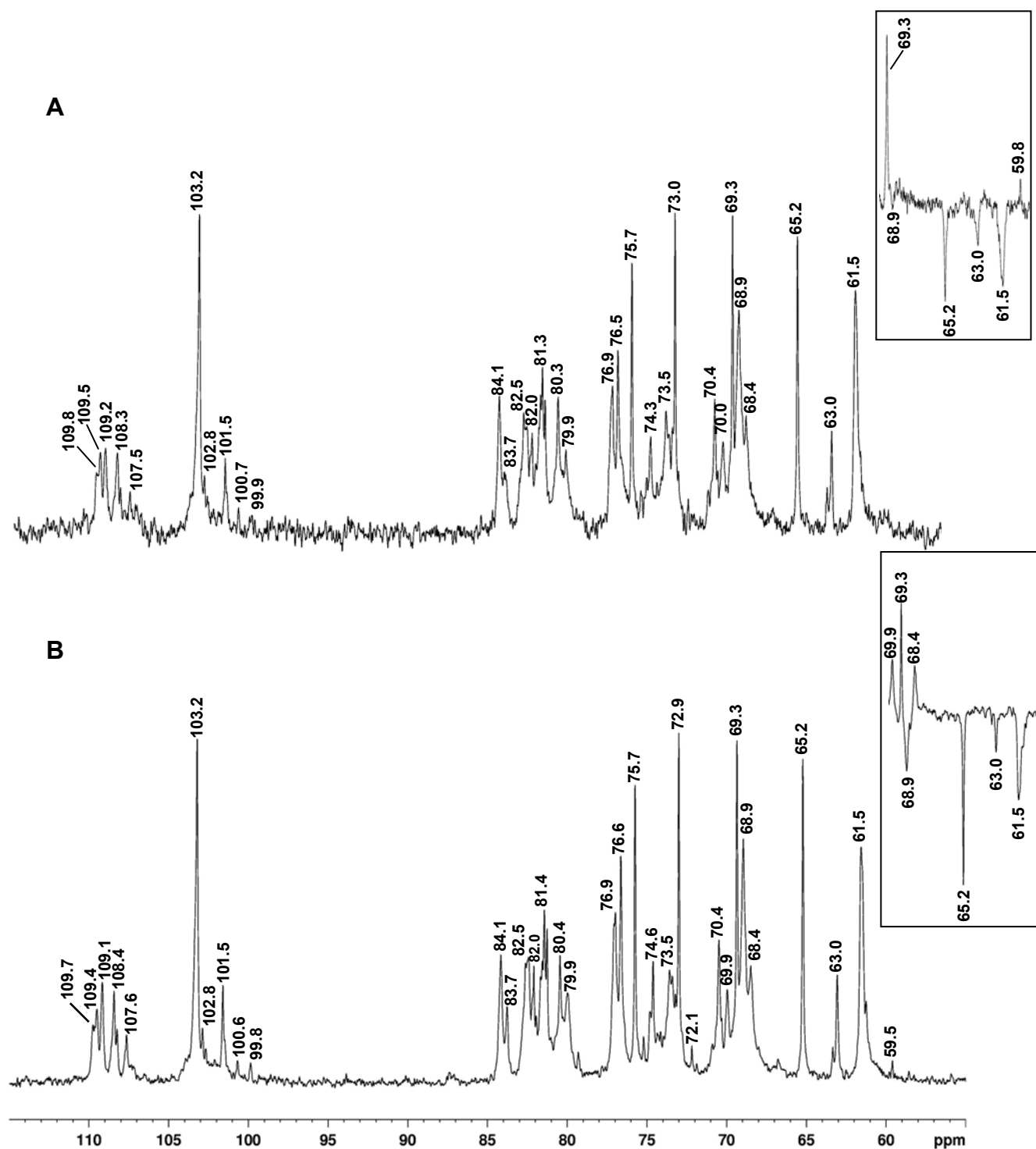


FIGURA 27 - ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DOS POLISSACARÍDEOS PPNA (A) E PPNEC (B). NO DETALHE: SINAIS INVERTIDOS NO ESPECTRO DE ^{13}C -DEPT

Solvente: D_2O a 50°C . Deslocamentos químicos são expressos em δ (ppm)

4.3 ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA POLPA DO PÊSSEGO – COMPARAÇÃO COM A GOMA DO FRUTO

O estudo da polpa do fruto foi idealizado pelo questionamento acerca da biossíntese da goma que por ele é produzida. Muito pouco se conhece neste contexto, por isso surgiu o interesse em verificar se existe na polpa algum polissacarídeo semelhante àquele que é exsudado em forma de goma. Desta maneira, o objetivo do estudo da polpa foi detectar a presença de arabinogalactanas (tipo II) e analisar sua estrutura química comparada com a estrutura do polissacarídeo da goma do fruto (PPNF).

A fração EAF foi analisada por HPSEC-MALLS (Figura 28) e pode-se observar a presença de um único pico detectado pelo espalhamento de luz e vários picos detectados pelo índice de refração, sugerindo a presença de uma mistura de polissacarídeos com diferentes massas moleculares e/ou a formação de agregados moleculares.

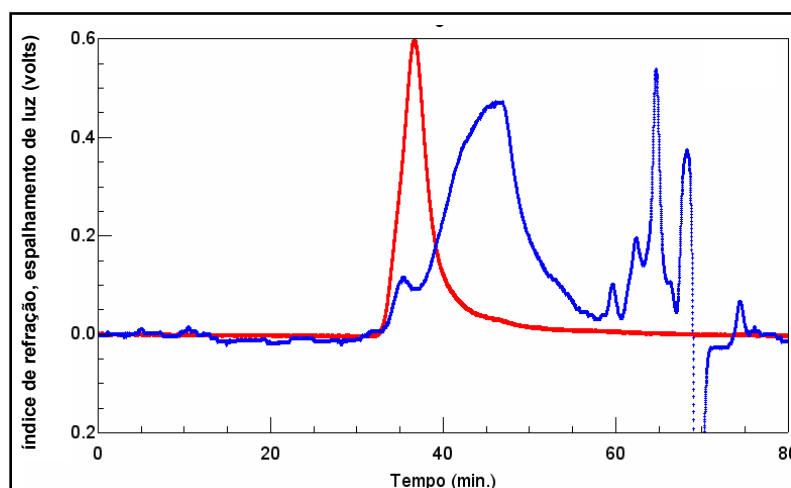


FIGURA 28 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO EAF POR HPSEC-MALLS UTILIZANDO OS DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (VERMELHO) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (AZUL)

O teor de proteínas de EAF, dosado através de teste colorimétrico, foi de 11%. Este valor pode estar superestimado devido a interferências com compostos fenólicos possivelmente presentes na polpa do pêssago. A análise de composição

monossacarídica de EAF mostrou a presença de ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose, glucose e ácido urônico na proporção de 2:26:3:1:15:11:42, respectivamente (Tabela 8). Esta composição pode sugerir a presença de polissacarídeos pécnicos, devido ao alto teor de ácidos urônicos, e também de arabinanas, galactanas e/ou arabinogalactanas, uma vez que arabinose e galactose foram os constituintes neutros mais abundantes. A composição monossacarídica dos polissacarídeos presentes na polpa de diferentes cultivares de pêssgo foi estudada por Kurz, Carle e Schieber (2008) e está de acordo com o resultados obtido nesse trabalho.

TABELA 8 - ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E TEOR DE PROTEÍNAS DA FRAÇÃO EAF

Fração	Proteína (%) ^a	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (%)						
EAF	11	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	ácido urônico ^b
		2	26	3	1	15	11	42

^{a,b} Dosado pelos métodos colorimétricos de HARTREE (1972) e FILIZETTI-COZZI e CARPITA (1991), respectivamente

O espectro de RMN-¹³C de EAF (Figura 29 A) apresentou vários sinais na região anomérica. O sinal em δ 100,3 pode ser atribuído às unidades de α -GalpA (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002; IACOMINI *et al.*, 2005) e o sinal em δ 99,3 às unidades de α -Rhap (RENARD *et al.*, 1998; CIPRIANI *et al.*, 2006). Os sinais em δ 109,2 - δ 106,3 correspondem às unidades de α -Araf, e o sinal em δ 103,1 é sugestivo de β -Galp (DELGOBO *et al.*, 1999; TISCHER; GORIN; IACOMINI, 2002). O sinal em δ 52,8 foi atribuído ao grupo -OCH₃ que esterifica a carboxila das unidades de ácido galacturônico, e o sinal em δ 19,9 sugere a presença de grupos acetil (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002; IACOMINI *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2006). O sinal em δ 16,5 corresponde ao C-6 (-CH₃) das unidades de ramnose (GORIN e MAZUREK, 1975). Em campo baixo, os sinais em δ 170,6 e δ 174,6 foram atribuídos às carboxilas esterificadas e não-esterificadas das unidades de ácido galacturônico (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002; ZHAO *et al.*, 2006).

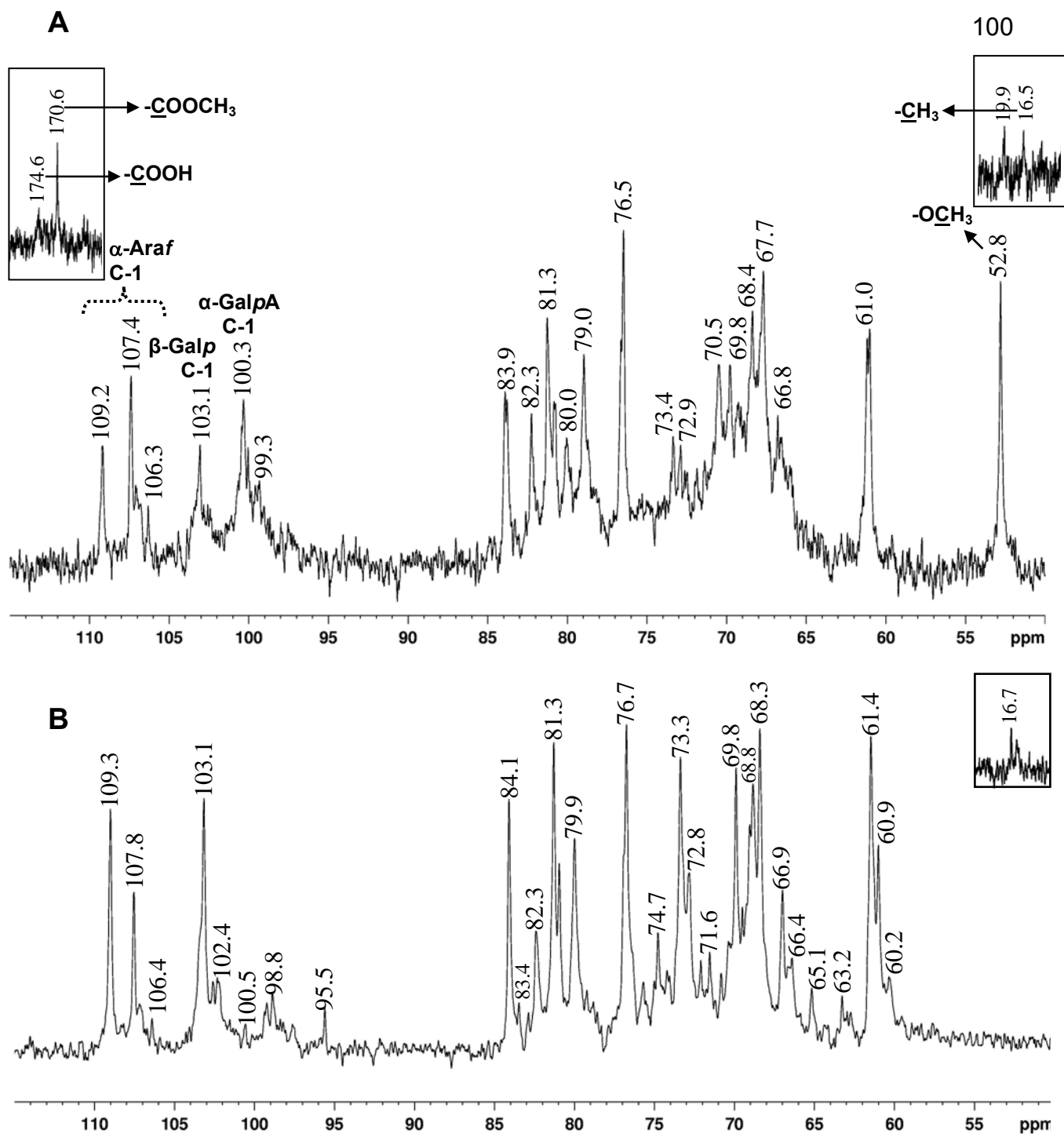


FIGURA 29 - ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF (A) E EAF-SG (B).
NOS DETALHES: REGIÕES DE $-\text{COOH}$ (ESQUERDA) E DE $-\text{CH}_3$ (DIREITA)

Solvente: D_2O a 70°C . Deslocamentos químicos são expressos em δ (ppm)

No intuito de purificar a possível arabinogalactana presente na fração EAF, vários procedimentos foram realizados (item 3.4.1), e a purificação foi monitorada por análise de composição monossacarídica, HPSEC e RMN-¹³C.

Após tratamento com TCA, a fração solúvel, EAF-STCA, mostrou-se composta por ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose, glucose e ácido urônico na proporção 2:20:2:1:12:3:60 (Tabela 9), composição esta semelhante à encontrada para EAF. A partir de EAF-STCA, foi realizado o processo de congelamento e descongelamento, gerando as frações EAF-SG (sobrenadante) e EAF-PG (precipitado). Esta última apresentou 93% de ácidos urônicos além de ramnose, arabinose e galactose (proporção 1:5:1) (Tabela 9). Este dado sugere que, com o processo de congelamento e descongelamento, os polissacarídeos pécticos do tipo homogalacturonanas foram eficientemente separados dos outros tipos de polissacarídeos presentes na polpa do pêssego. A fração EAF-SG apresentou como componentes monossacarídicos neutros ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose na proporção 2:30:6:3:48:11 (Tabela 9), sugerindo a presença de arabinogalactanas. O espectro de RMN-¹³C desta fração (Figura 29 B, p. 99) corrobora os dados de composição monossacarídica, indicando que esta etapa de purificação foi eficiente para eliminar grande parte das homogalacturonanas presentes em EAF, uma vez que ocorreu um aumento do sinal referente ao C-1 das unidades de β -Galp (δ 103,1) e a ausência do sinal em δ 52,8, referente ao grupo –OCH₃ que esterifica as carboxilas das unidades de ácido galacturônico.

TABELA 9 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA POLPA DO PÊSSEGO (EAF, EAF-STCA, EAF-SG, EAF-SF E EAF-SFH₂O) EM COMPARAÇÃO COM O POLISSACARÍDEO PPNF

FRAÇÕES	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (%)						
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	ácido urônico ^a
EAF	2	26	3	1	15	11	42
EAF-STCA	2	20	2	1	12	3	60
EAF-PG	1	5	tr.	tr.	1	tr.	93
EAF-SG	2	30	6	3	48	11	nd.
EAF-SF	1	36	5	2	45	2	9
EAF-SFH ₂ O	2	41	5	1	45	4	2
PPNF	tr.	32	13	2	33	-	20

^a Dosado pelo método colorimétrico de FILIZETTI-COZZI e CARPITA (1991); tr.: traços < 1%; nd.: não determinado

Devido à heterogeneidade de EAF-SG, esta fração foi submetida à precipitação com solução de Fehling, gerando as frações EAF-SF (sobrenadante) e EAF-PF (precipitado). CIPRIANI *et al.* (2006), estudando os polissacarídeos das folhas de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), utilizaram esta mesma metodologia e isolaram uma arabinogalactana do tipo II a partir do sobrenadante obtido por precipitação com solução de Fehling. Desta forma, a fração EAF-SF foi escolhida para dar continuidade à análise das arabinogalactanas da polpa do pêsseso. A fração EAF-SF é composta por ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose, glucose e ácido urônico na proporção 1:36:5:2:45:2:9 (Tabela 9), composição esta muito semelhante à encontrada para a fração EAF-SG. Embora uma fração homogênea não tenha sido obtida (Figura 30), a composição monossacarídica e a análise de metilação de EAF-SF (Tabela 10) indicam a presença de arabinogalactanas do tipo II semelhantes à encontrada no polissacarídeo da goma do fruto (PPNF).

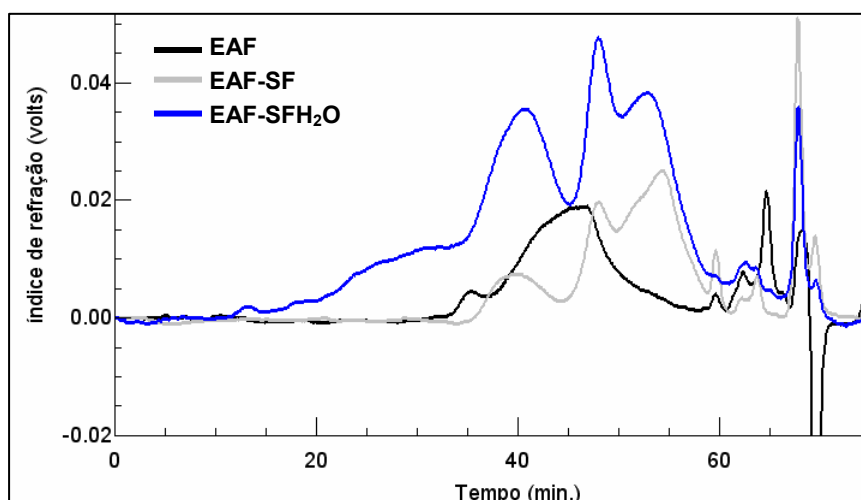


FIGURA 30 - PERFIS DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES EAF-SG, EAF-SF E EAF-SFH₂O POR HPSEC UTILIZANDO O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO

Através da análise de metilação de EAF-SF (Tabela 10), verificou-se que as unidades de arabinose encontram-se majoritariamente como terminais não redutores (24%) e O-5- (Araf) e/ou O-4-substituídas (Arap) (13%). Estes dois derivados também foram encontrados no polissacarídeo PPNF (Tabela 10), da goma do fruto, embora a quantidade de terminais não redutores de arabinofuranose tenha sido relativamente menor (16%). As unidades de galactose encontram-se na forma 3-O- (9%), 6-O- (4%) e, principalmente 3,6-di-O-substituídas (29%), indicando a presença de arabinogalactana do tipo II altamente substituída, com ligações do tipo (1→3) e substituída em O-6, majoritariamente, por cadeias laterais e terminais não redutores de arabinofuranose. Os derivados metilados, relativos às unidades de galactose, encontrados para PPNF apresentaram praticamente as mesmas proporções daquelas encontradas para a fração EAF-SF, sugerindo a alta similaridade estrutural. O espectro de RMN-¹³C de EAF-SF (Figura 31 A) está de acordo com os dados de metilação e apresenta, na região anomérica, sinais em δ 109,1 - 106,5 e δ 103,2 referentes às unidades de α -Araf e β -Galp, respectivamente (DELGOBO *et al.*, 1999).

TABELA 10 - ANÁLISE DE METILAÇÃO COMPARATIVA DAS FRAÇÕES EAF-SF, EAF-SFH₂O E PPNF

Alditóis acetatos parcialmente O-metilados ^a	Tipo de ligação correspondente	Tr. ^b	Frações polissacarídicas (%) ^c		
			EAF-SF	EAF-SFH ₂ O	PPNF
2,3,5-Me ₃ -Ara	Araf-(1→	7:08	24	18	16
2,3,4-Me ₂ -Ara	Arap-(1→	7:54	2	tr.	-
2,3,4-Me ₂ -Xyl	Xylp-(1→	7:62	3	4	16
2,5-Me ₂ -Ara	→3)-Araf-(1→	8:25	3	4	3
2,3-Me ₂ -Ara	→5)-Araf-(1→, →4)-Arap-(→	9:32	13	10	12
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Galp-(1→	9:49	3	4	3
2,3 < 3,4-Me ₂ -Xyl	→4)-Xylp-(1→, →2)-Xylp-(1→	9:72	tr.	2	-
2-Me-Ara	→3,5)-Araf-(1→, →3,4)-Arap-(1→	11:57	2	2	-
2,4,6-Me ₃ -Gal	→3)-Galp-(1→	12:02	9	8	7
3-Me-Xyl	→2,4)-Xylp-(1→	12:11	2	2	-
3,4,6-Me ₃ -Gal	→2)-Galp-(1→	12:39	tr.	2	-
2,3,6-Me ₃ -Gal	→4)-Galp-(1→	12:62	2	2	-
2,3,4-Me ₃ -Gal	→6)-Galp-(1→	14:20	4	9	4
4,6-Me ₂ -Gal	→2,3)-Galp-(1→	14:43	tr.	2	4
2,6-Me ₂ -Gal	→3,4)-Galp-(1→	14:96	tr.	tr.	3
2,3-Me ₂ -Gal	→4,6)-Galp-(1→	18:11	2	2	-
2,4-Me ₂ -Gal	→3,6)-Galp-(1→	19:71	29	27	26
2-Me-Gal	→3,4,6)-Galp-(1→	22:73	2	2	6

^a Metilação realizada segundo CIUCANU e KEREK (1984). Após metilação, os derivados foram hidrolisados pelo método descrito por SAEMAN *et al.* (1954) (pré-hidrólise de 1 h e hidrólise de 16 h);

^b Tempo de retenção (min.) dos derivados em coluna DB-225; ^c Percentual relativo dos derivados metilados nos polissacarídeos; tr.: traços < 1%

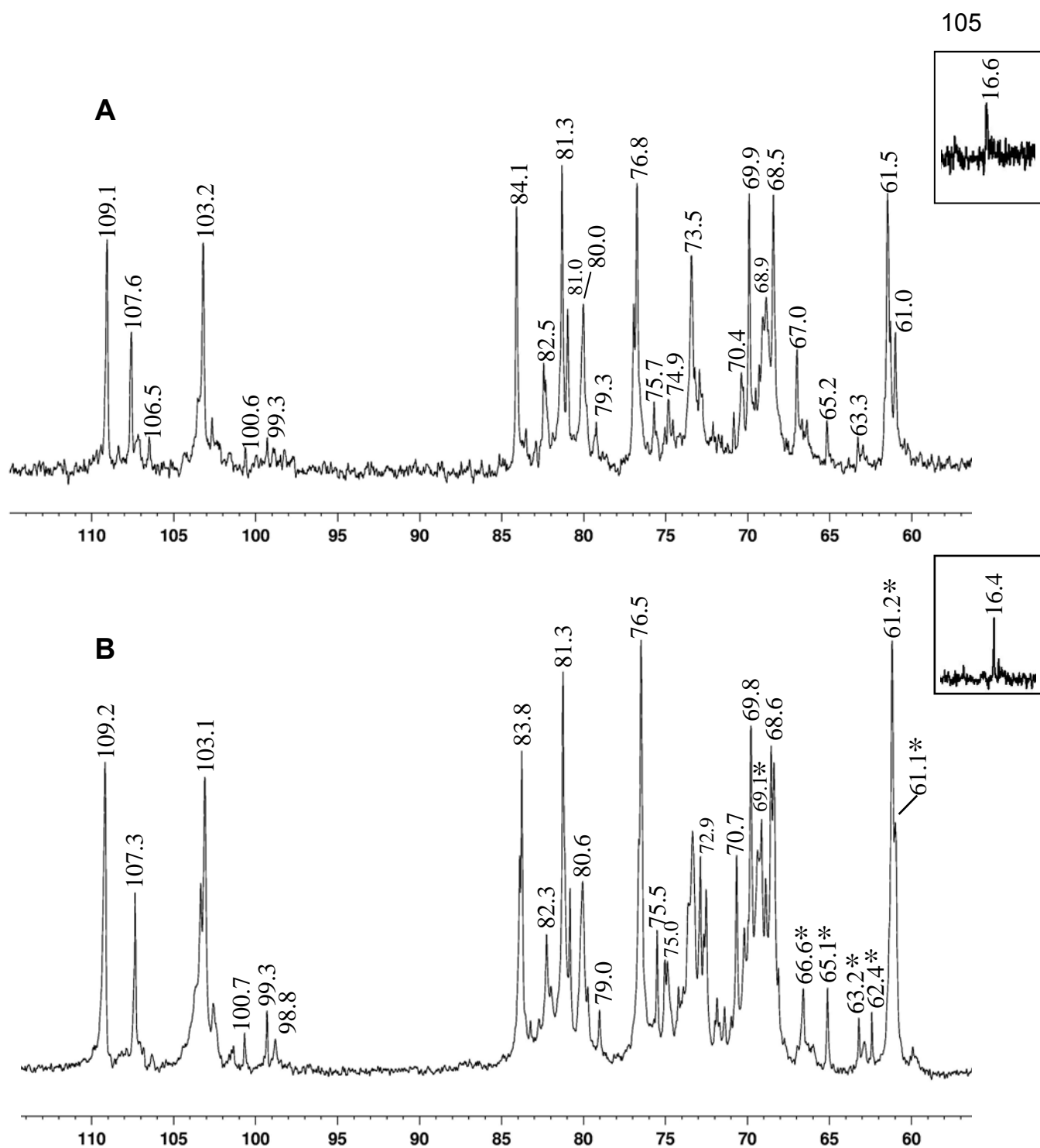


FIGURA 31 - ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-SF (A) E EAF-SFH $_2\text{O}$ (B). NOS DETALHES: REGIÃO DE $-\text{CH}_3$. * SINAIS INVERTIDOS NO ESPECTRO DE ^{13}C -DEPT

Solvente: D $_2$ O a 70 °C. Deslocamentos químicos são expressos em δ (ppm)

Na tentativa de obter uma fração mais homogênea, a fração EAF-SF foi aplicada em coluna de troca aniônica e eluída com água e concentrações crescentes de NaCl. A fração eluída com água, EAF-SFH₂O, apresentou um perfil por HPSEC (Figura 30, p. 102) muito parecido com o perfil de EAF-SF, o que pode sugerir que estruturas semelhantes com tamanhos diferentes estão sendo purificadas conjuntamente.

A fração EAF-SFH₂O mostrou-se composta por ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose, glucose e ácido urônico na proporção 2:41:5:1:45:4:2, respectivamente (Tabela 9, p. 101). A mesma semelhança observada no HPSEC é verificada na análise de metilação (Tabela 10, p. 103) e no espectro de RMN-¹³C (Figura 31 B, p. 104), em que as frações EAF-SF e EAF-SFH₂O apresentam alta similaridade. No experimento de RMN ¹³C-DEPT (Figura 31 B – detalhe, p. 104), os sinais referentes aos grupos –CH₂ puderam ser evidenciados. O sinal em δ 69,1 indica a presença de C-6 substituído de β -Galp, confirmando os dados de metilação (2,3,4-Me₃-Gal – 9%, 2,4-Me₂-Gal – 27%). O sinal em δ 65,1 pode ser atribuído ao C-5 das unidades de β -Xylp (SIMAS *et al.*, 2004) e os sinais em δ 61,2 e δ 61,1 ao C-6 não substituído das unidades de β -Galp e C-5 de terminais não redutores de α -Araf, respectivamente (MENESTRINA *et al.*, 1998; DELGOBO *et al.*, 1999; TISCHER; GORIN; IACOMINI, 2002). O sinal em δ 66,6 é sugestivo de C-5 substituído de unidades de α -Araf (PETKOWICZ *et al.*, 1998).

Comparando os dados de composição monossacarídica (Tabela 9, p. 101), metilação (Tabela 10, p. 103) e os espectros de RMN-¹³C das frações EAF-SFH₂O (Figura 32 A), rica em arabinogalactanas do tipo II da polpa do fruto, e PPNF (Figura 32 B), arabinogalactana da goma do fruto, observam-se semelhanças e algumas diferenças. A quantidade de ácidos urônicos é significativamente diferente, uma vez que o polissacarídeo PPNF apresenta 20% comparado a 2% na fração EAF-SFH₂O. Outra diferença está na quantidade de xilose. Estes monossacarídeos não são encontrados em arabinogalactanas de parede celular, entretanto, pertencem a terminais não redutores na estrutura do PPNF.

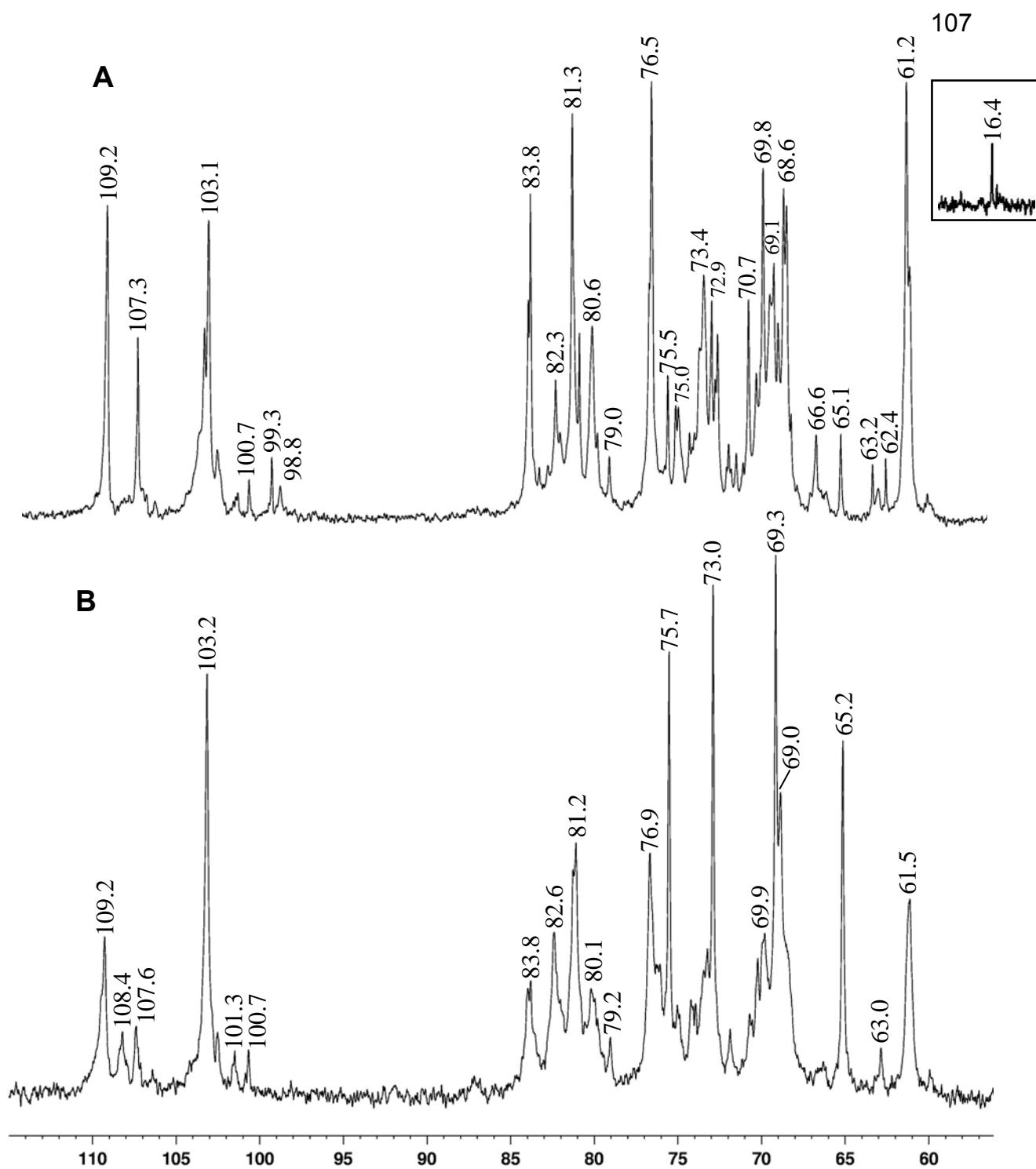


FIGURA 32 - ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-SFH $_2\text{O}$ (A) E PPNF (B). DETALHE: REGIÃO DE $-\text{CH}_3$

Solvente: D $_2$ O a 70 °C (EAF-SFH $_2\text{O}$) e 50 °C (PPNF). Deslocamentos químicos são expressos em δ (ppm)

A goma produzida pelos frutos de *Chorisia speciosa* (paineira) é constituída por uma arabinogalactana tipo II e a mesma estrutura foi encontrada no mesocarpo destes frutos (BELESKI-CARNEIRO; GANTER; REICHER, 1999). Joseleau e Ullmann (1990), estudando a biossíntese da goma arábica, também encontraram polissacarídeos semelhantes a ela em algumas regiões do caule.

As análises comparativas entre a polpa e a goma exsudada pelo pêssego, realizadas nesta pesquisa, apóiam a hipótese de que o polissacarídeo que é exsudado pelo fruto em condições de estresse, físico ou patológico, já se encontra pré-formado na polpa. Análises da estrutura química fina das arabinogalactanas da goma e da polpa do fruto seriam importantes para tal confirmação. Diferenças estruturais quantitativas poderiam estar relacionadas à presença de enzimas como β -galactosidases e α -arabinofuranosidades envolvidas no processo de amadurecimento do fruto (GOULAO e OLIVEIRA, 2007).

4.4 ANÁLISES REOLÓGICAS DA GOMA PRODUZIDA PELO TRONCO DO PESSEGUEIRO

4.4.1 Viscosidade intrínseca da fração EA

A viscosidade intrínseca do extrato aquoso da goma do pessegueiro (EA) foi determinada a 22 °C em KCl 0,5 M e o gráfico de Huggins com os dados experimentais obtidos está apresentado na Figura 33. Analisando a equação de Huggins, o coeficiente linear corresponde ao valor de viscosidade intrínseca, igual a 1,95 dl.g⁻¹. Este valor é alto quando comparado com os resultados descritos na literatura para gomas do tipo arabinogalactanas substituídas. A goma arábica e a goma de mesquita, por exemplo, apresentaram viscosidade intrínseca, em NaCl 0,1M a 20 °C, de 0,19 dl.g⁻¹ e 0,11 dl.g⁻¹, respectivamente (GOYCOOLEA *et al.*, 1995). Outros exemplos dentro deste grupo são as gomas do cajueiro, de *Albizia lebbek* e de *Enterolobium contortisiliquum*, que apresentaram viscosidade intrínseca, em NaCl 1M a 25 °C, de 0,09 dl.g⁻¹ (PAULA e RODRIGUES, 1995), 0,23 dl.g⁻¹ (PAULA; SANTANA; RODRIGUES, 2001) e 0,86 dl.g⁻¹ (OLIVEIRA *et al.*, 2001),

respectivamente. Entretanto, a fração solúvel da goma tragacanto (tragacantina), composta por uma mistura de arabinogalactana e glicanoramnogalacturonana, apresentou um valor de viscosidade intrínseca, em NaCl 0,1M a 25 °C, dez vezes mais alto do que o da goma do pessegueiro, sendo igual a 19,6 dl.g⁻¹ (MOHAMMADIFAR *et al.*, 2006).

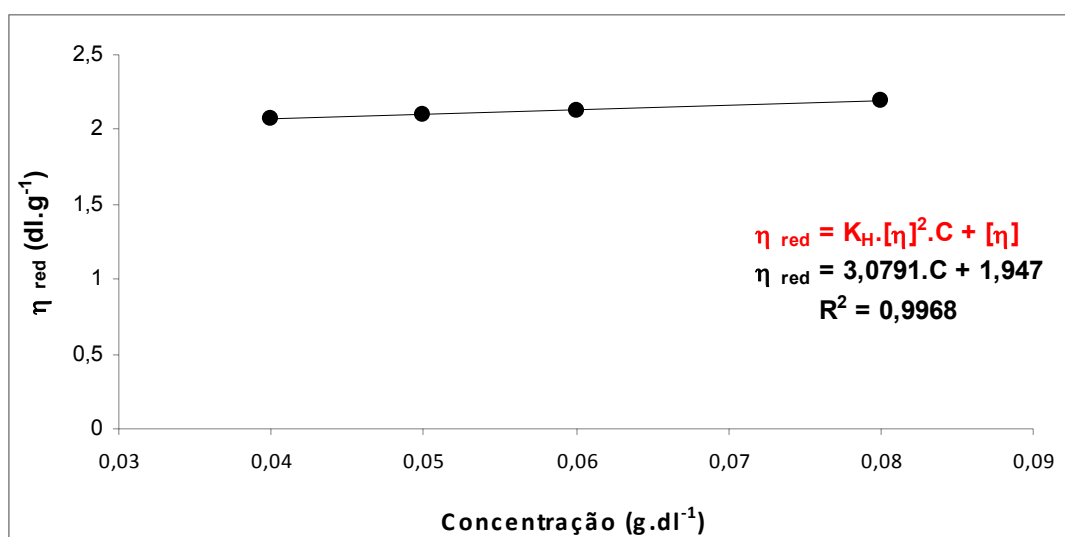


FIGURA 33 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE INTRÍNSECA $[\eta]$ DO EXTRATO AQUOSO (EA) DA GOMA DO PESSEGUIRO

4.4.2 Avaliação do comportamento de fluxo das frações EA, GR e POLI

Com o objetivo de analisar o comportamento de fluxo das amostras EA (extrato aquoso), GR (gel retido) e POLI (polissacarídeo nativo), na concentração 4 % (m/v), foram realizadas curvas de viscosidade que estão apresentadas na Figura 34. Observa-se que as três amostras possuem típico comportamento pseudoplástico, não-newtoniano, onde em todas as taxas de cisalhamento analisadas ocorre uma diminuição nos valores de viscosidade. A fração EA é a que apresenta maiores valores de viscosidade em todas as taxas de cisalhamento utilizadas e as frações GR e POLI apresentam valores de viscosidade menores e semelhantes entre si (Tabela 11). Vale ressaltar que, como a fração GR forma uma

dispersão heterogênea, os grumos de géis presentes podem ter influenciado este resultado, uma vez que, ao aumentar a taxa de cisalhamento, estes eram “expelidos” para fora do sensor. A maioria das gomas descritas na literatura apresentam comportamento de fluxo pseudoplástico, a exemplo das gomas de *Mesona blumes* (TAO *et al.*, 2007), *Enterolobium contortisiliquum* (OLIVEIRA *et al.*, 2001) e goma tragacanto (MOHAMMADIFAR *et al.*, 2006).

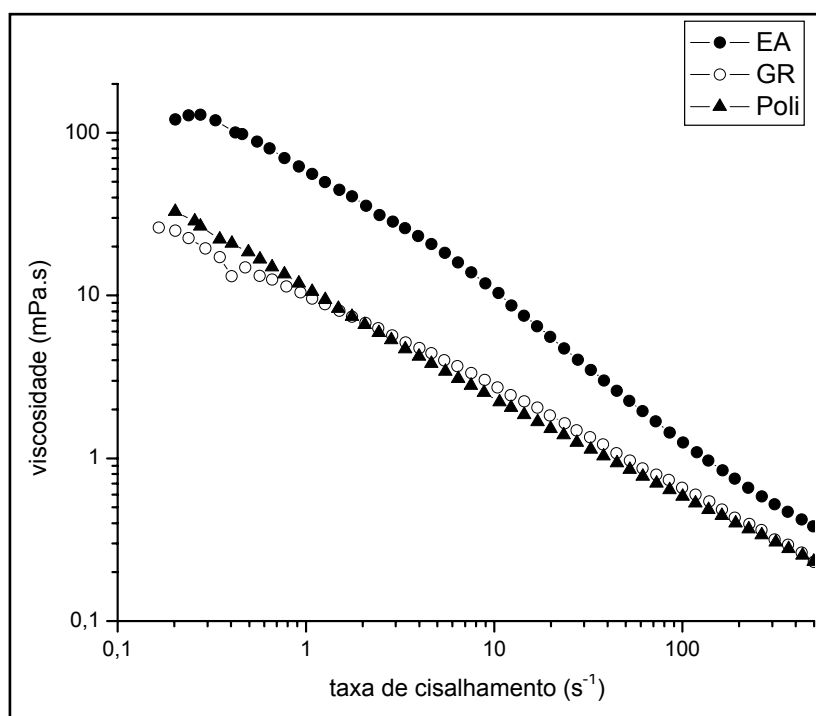


FIGURA 34 - CURVAS DE VISCOSIDADE DAS FRAÇÕES EA, GR E POLI SOLUBILIZADAS EM ÁGUA (4 % m/v)

Análises realizadas a 25 °C com sensor placa-placa PP35Ti

TABELA 11 - VARIAÇÃO DA VISCOSIDADE APARENTE DAS FRAÇÕES EA, POLI E GR (4 % m/v) EM DIFERENTES TAXAS DE CISALHAMENTO

Taxa de cisalhamento (s^{-1})	Viscosidade (mPa.s)		
	EA	POLI	GR
1	62,25	11,91	10,47
10	10,37	2,22	2,73
100	1,25	0,58	0,66

Amostras solubilizadas em água. Análises realizadas a 25° C com sensor placa-placa PP35Ti

Analisando as curvas de viscosidade da fração EA em diferentes concentrações (1, 2, 3, 4 e 5 %, m/v) (Figura 35), observa-se que a viscosidade é dependente da concentração. A uma taxa de cisalhamento de 1 s^{-1} os valores de viscosidade encontrados para a fração EA nas concentrações 1, 2, 3, 4 e 5 % (m/v) foram de 0,87, 5,33, 26,78, 55,99 e 89,75 mPa.s, respectivamente. Em todas as concentrações analisadas, a fração EA apresentou comportamento pseudoplástico, sem formação de um patamar newtoniano. Em concentrações superiores a 5 % (m/v), não foi possível obter um gel homogêneo devido à alta viscosidade, e, desta forma, a fração EA não foi analisada em tais concentrações. O efeito da concentração na viscosidade das soluções também foi observado nas gomas do cajueiro, goma arábica (MOTHÉ e RAO, 1999), goma de *Albizia lebbbeck* (PAULA; SANTANA; RODRIGUES, 2001) e goma de *Enterolobium contortisiliquum* (OLIVEIRA *et al.*, 2001), porém, comparativamente, este efeito foi mais pronunciado para a goma do pessegueiro.

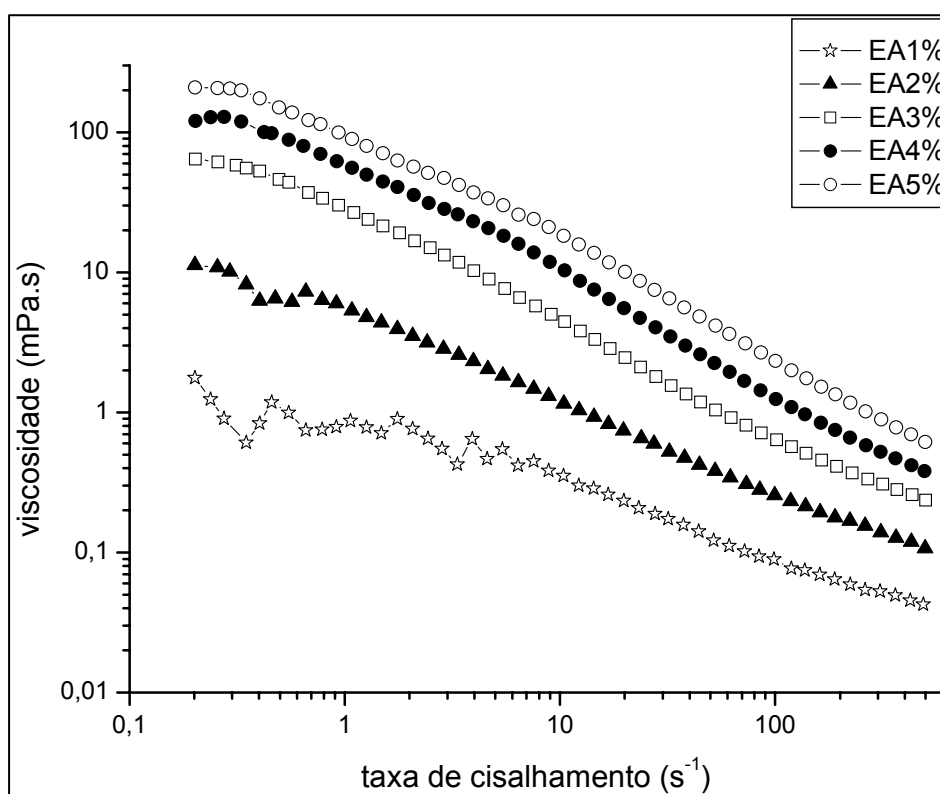


FIGURA 35 - CURVAS DE VISCOSIDADE DA FRAÇÃO EA SOLUBILIZADA EM ÁGUA NAS CONCENTRAÇÕES 1, 2, 3, 4 E 5 % (m/v)

Análises realizadas a 25 °C com sensor placa-placa PP35Ti

Como o polissacarídeo que compõe a goma do pessegueiro apresenta ácidos urônicos em sua estrutura, ou seja, é um polieletrólito, o comportamento de fluxo da fração EA a 4 % (m/v) também foi analisado em soluções salinas de NaCl 0,1M, KCl 0,1M e 0,5M e CaCl₂ 0,1M. Na taxa de cisalhamento de 10 s⁻¹, EA apresentou valores de viscosidade menores quando foi solubilizada nas soluções salinas do que quando solubilizada em água (Tabela 12). Outro aspecto a ser destacado é que a solubilização com KCl 0,5M e CaCl₂ 0,1M produziu amostras com menor a viscosidade quando comparada com as outras condições analisadas.

A diminuição da viscosidade na presença de sais é comum em polieletrólitos. Quando solubilizadas em água, as cadeias polissacarídicas se encontram expandidas pela repulsão eletrostática intramolecular, formando soluções com maior viscosidade. A adição de sal elimina esta repulsão e provoca uma contração nas cadeias permitindo que elas assumam uma conformação mais compacta, reduzindo, assim, a viscosidade da solução (NDJOUENKEU *et al.*, 1996). A goma tragacanto, composta majoritariamente por ácido galacturônico, também teve sua viscosidade diminuída quando solubilizada em solução salina (MOHAMMADIFAR *et al.*, 2006).

TABELA 12 - VARIAÇÃO DA VISCOSIDADE APARENTE DA FRAÇÃO EA (4% m/v) EM ÁGUA E DIFERENTES SOLUÇÕES SALINAS A UMA TAXA DE CISALHAMENTO DE 10 s⁻¹

Solvente	Viscosidade (mPa.s) EA 4% (m/v)
H ₂ O	6,13
NaCl 0,1M	4,35
KCl 0,1M	5,17
KCl 0,5M	3,70
CaCl ₂ 0,1M	3,55

Análises realizadas a 25° C com sensor placa-placa PP35Ti

4.4.3 Análises dinâmico-oscilatórias

Para analisar o comportamento viscoelástico das amostras, o efeito da variação da frequência sobre os módulos elástico (G') e viscoso (G'') foi analisado (varredura de frequência). Os valores de tensão utilizados nas varreduras de frequência das frações GR, EA e POLI foram 1, 0,8 e 0,8 Pa, respectivamente. As tensões escolhidas geraram nas amostras deformações inferiores a 10 %, estando de acordo com a faixa de valores utilizada para análises reológicas de polissacarídeos (RIDOUT *et al.*, 1998, citado por OLIVEIRA, 2001).

As varreduras de frequência das amostras EA, GR e POLI na concentração de 4 % (m/v) estão apresentadas na Figura 36. Observa-se que, em toda a faixa de frequência, as frações EA e GR apresentaram um comportamento típico de gel, com valores de G' maiores do que G'' , praticamente paralelos em toda a faixa analisada (MORRIS, 1995). Segundo Lapasin e Prici (1995), um gel pode ser considerado verdadeiro quando a razão G'/G'' é superior a 3 e isto foi observado para as frações GR e EA (Tabela 13) em toda a faixa de frequência analisada. A fração GR compreende um gel mais forte que EA, uma vez que seus valores de G' são aproximadamente 10x maiores do que os valores encontrados para EA, em praticamente toda a faixa de frequência analisada (Tabela 13). Em contrapartida, a fração POLI, na frequência de 0,01 Hz, apresentou valores de G' e G'' praticamente iguais (Tabela 13) e, apenas na faixa de 0,02 a 3 Hz, mostrou comportamento de gel com valores de G' maiores do que G'' . Após 3 Hz, houve inversão dos módulos, sugerindo a desestruturação do gel em altas frequências. A análise visual das três frações está de acordo com este resultado, onde observa-se um aumento da força do gel na ordem $POLI < EA < GR$.

Na goma tragacanto, a fração insolúvel (bassorina), que corresponderia à fração GR, possui comportamento de gel enquanto que a fração solúvel (tragacantina), que corresponderia à fração EA, apresenta um comportamento de solução concentrada (MOHAMMADIFAR *et al.*, 2006).

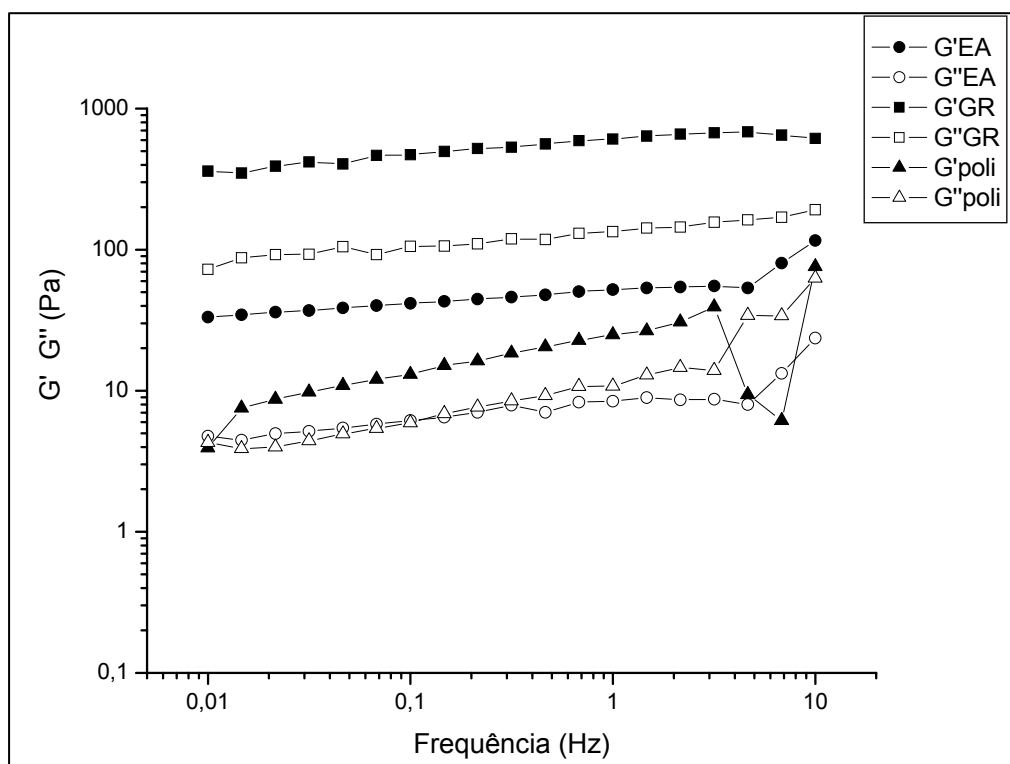


FIGURA 36 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DAS FRAÇÕES GR, EA E POLI (4 % m/v) SOLUBILIZADAS EM ÁGUA

Análises realizadas a 25 °C com sensor placa-placa PP35Ti e tensões fixas de 0,8 (EA e POLI) e 1 (GR) Pa

TABELA 13 - VARIAÇÃO DO MÓDULO ELÁSTICO (G') DAS FRAÇÕES GR, EA E POLI (4 % m/v) EM DIFERENTES FREQUÊNCIAS

Frequência (Hz)	GR		EA		POLI	
	G' (Pa)	G'/G''	G' (Pa)	G'/G''	G' (Pa)	G'/G''
0,01	360,7	5,0	33,2	7,0	3,9	0,9
0,1	470,7	4,5	41,7	6,8	13,0	2,2
1	607,2	4,5	52,1	6,2	24,9	2,3
10	616,3	3,2	116,0	4,9	75,7	1,2

Amostras solubilizadas em água. Análises realizadas a 25° C com sensor placa-placa PP35Ti

A fração EA também foi analisada quanto a seu comportamento viscoelástico nas concentrações 2, 3 e 5 % (m/v) (Figura 37). A fração EA na concentração 2 % (m/v) (Figura 37) apresentou comportamento de uma solução concentrada ou de gel fraco (MORRIS, 1995), onde, em frequências menores que 0,03 Hz, observam-se valores de $G'' > G'$ e, em frequências maiores, ocorre inversão dos módulos, permanecendo a resposta elástica (G') superior à viscosa (G'') até a frequência de 3 Hz. Nas concentrações 3, 4 e 5 % (m/v), a fração EA apresentou comportamento de gel, com $G'/G'' > 3$ em praticamente toda a faixa de frequência analisada (Figura 37) (Tabela 14). Com base nos valores de G' (Tabela 14) observa-se que a força do gel tende a aumentar com o aumento da concentração de EA. Analisando a goma karaya (*Sterculia* sp.) e a goma de *Sterculia striata*, BRITO *et al.* (2005) verificaram que a goma karaya formava géis verdadeiros a partir da concentração 2 % (m/v) ($G'/G'' = 3,6$) enquanto que em *S. striata* géis verdadeiros eram formados apenas em concentrações acima de 4 % (m/v) ($G'/G'' = 2,6$). Neste caso, o grau de acetilação dos polissacarídeos parece ser essencial para a formação dos géis.

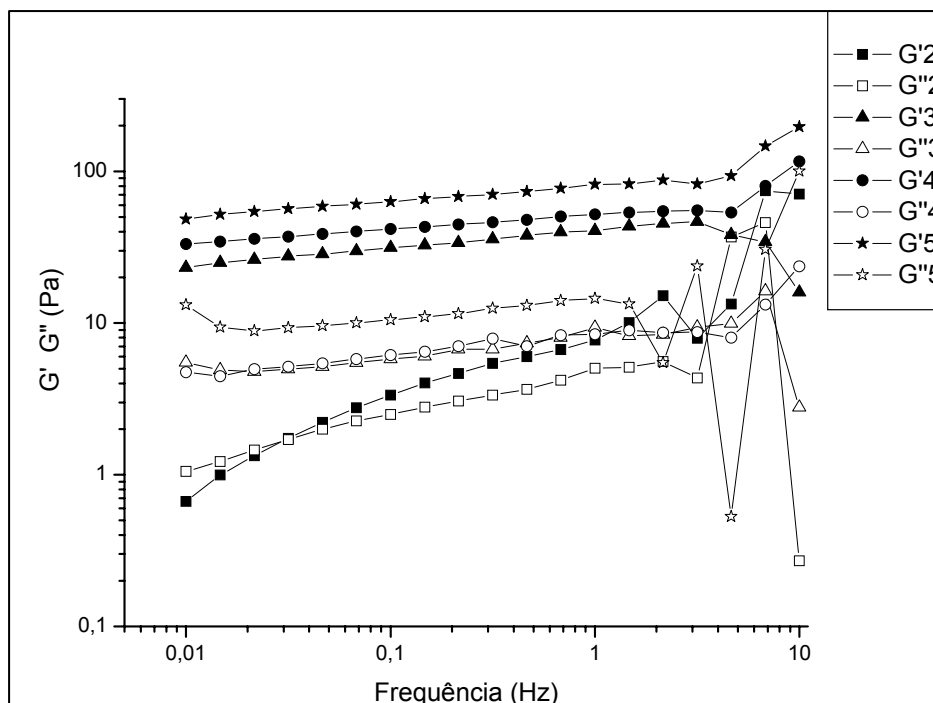


FIGURA 37 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DA FRAÇÃO EA SOLUBILIZADA EM ÁGUA NAS CONCENTRAÇÕES 2, 3, 4 E 5 % (m/v)

Análises realizadas a 25 °C com sensor placa-placa PP35Ti e tensão fixa de 0,8 Pa

TABELA 14 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO NOS VALORES DE G' (MÓDULO ELÁSTICO) E G'' (MÓDULO VISCOSO) DA FRAÇÃO EA NAS FREQUÊNCIAS DE 0,1 E 1 Hz

EA (% m/v)	0,1 Hz		1 Hz	
	G' (Pa)	G'/G''	G' (Pa)	G'/G''
2	3,3	1,3	7,7	1,5
3	31,3	5,4	40,5	4,4
4	41,7	6,7	52,1	6,2
5	63,1	6,3	82,2	5,7

Amostras solubilizadas em água. Análises realizadas a 25° C com sensor placa-placa PP35Ti

Para verificar a influência dos sais na força do gel formado por EA, esta amostra foi solubilizada em NaCl 0,1M, KCl 0,1M e 0,5M e CaCl_2 0,1M, na concentração 4 % (m/v), sendo posteriormente analisada através de varreduras de frequência comparativamente com a amostra solubilizada em água. Através da Figura 38 e da Tabela 15, observa-se que, na presença das soluções salinas, ocorre a formação de géis mais fracos do que em água e isso é evidenciado pelos menores valores de G' encontrados em toda a faixa de frequência analisada. O mesmo efeito foi observado nos géis formados pela goma karaya, goma de *Sterculia striata* (BRITO *et al.*, 2005) e pela goma tragacanto (MOHAMMADIFAR *et al.*, 2006) quando estas foram solubilizadas em NaCl 0,1M. Estes polissacarídeos têm em comum a presença de grupos ácidos, como ácidos urônicos, importantes para as interações intra e intermoleculares que levam à formação dos géis. Provavelmente, a adição de sais neutraliza estas cargas iônicas, levando a alterações na conformação do polissacarídeo e à diminuição da força do gel.

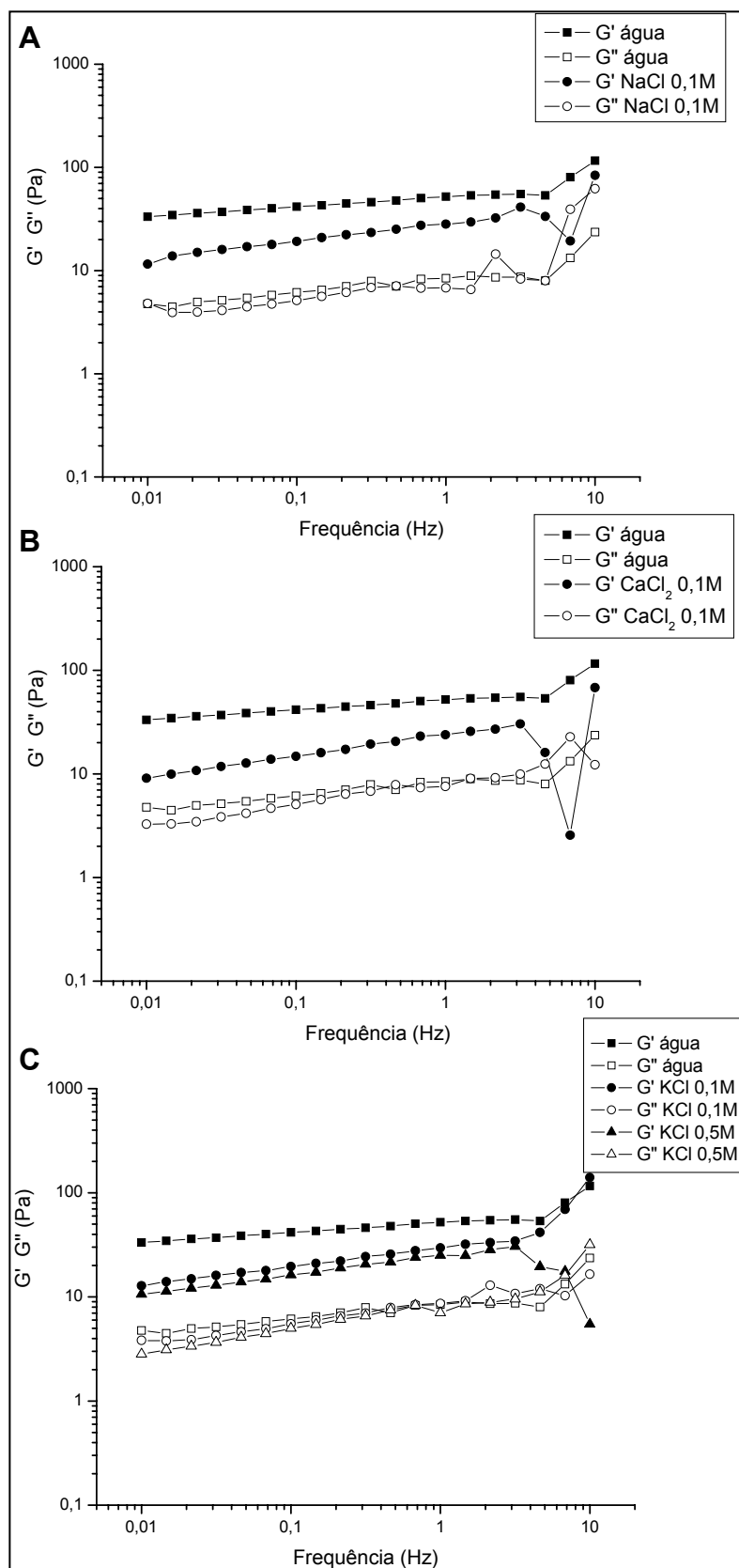


FIGURA 38 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DA FRAÇÃO EA SOLUBILIZADA EM ÁGUA E EM NaCl 0,1M (A), CaCl_2 0,1M (B) E KCl 0,1M e 0,5M (C) NA CONCENTRAÇÃO 4 % (m/v)

Análises realizadas a 25 °C com sensor placa-placa PP35Ti e tensão fixa de 0,7 Pa

TABELA 15 – EFEITO DA ADIÇÃO DE SAIS NOS VALORES DE G' E G'/G'' DA FRAÇÃO EA (4 % m/v) NAS FREQUÊNCIAS DE 0,1 E 1 Hz

solvente	0,1 Hz		1 Hz	
	G' (Pa)	G'/G''	G' (Pa)	G'/G''
H ₂ O	41,7	6,7	52,1	6,2
NaCl 0,1M	23,7	4,0	34,6	3,8
KCl 0,1M	19,6	3,6	29,6	3,4
KCl 0,5M	15,4	3,4	23,5	3,6
CaCl ₂ 0,1M	14,8	2,9	23,9	3,1

Amostras solubilizadas em água. Análises realizadas a 25° C com sensor placa-placa PP35Ti

Com o intuito de avaliar a termoestabilidade dos géis formados por EA e GR a 4 % (m/v), o comportamento viscoelástico destas amostras foi avaliado em diferentes temperaturas que variaram de 5 a 95 °C, em frequência fixa de 1 Hz. O experimento foi também realizado no resfriamento, de 95 a 5 °C, para analisar se o comportamento dos géis voltava a ser o mesmo após exposição a altas temperaturas.

Através da Figura 39, observa-se que as três amostras (GR, EA e POLI) apresentaram estabilidade térmica, tendo caráter de gel em todas as temperaturas testadas. Durante o aquecimento, os valores de G' e G'' mantiveram-se praticamente constantes e, durante o resfriamento, apresentaram pequenas alterações em relação ao aquecimento. Para as frações EA e GR, os valores de G' foram maiores durante o resfriamento, possivelmente devido a uma leve perda de água ou formação de interações adicionais na rede do gel. Para a fração POLI, os valores de G' no resfriamento foram menores, sugerindo perda de algumas interações responsáveis pela força do gel, após o aquecimento. Os géis da goma karaya e da goma de *S. striata* também apresentaram termoestabilidade na faixa de 5 a 85 °C, na frequência de 1 Hz (BRITO *et al.*, 2005).

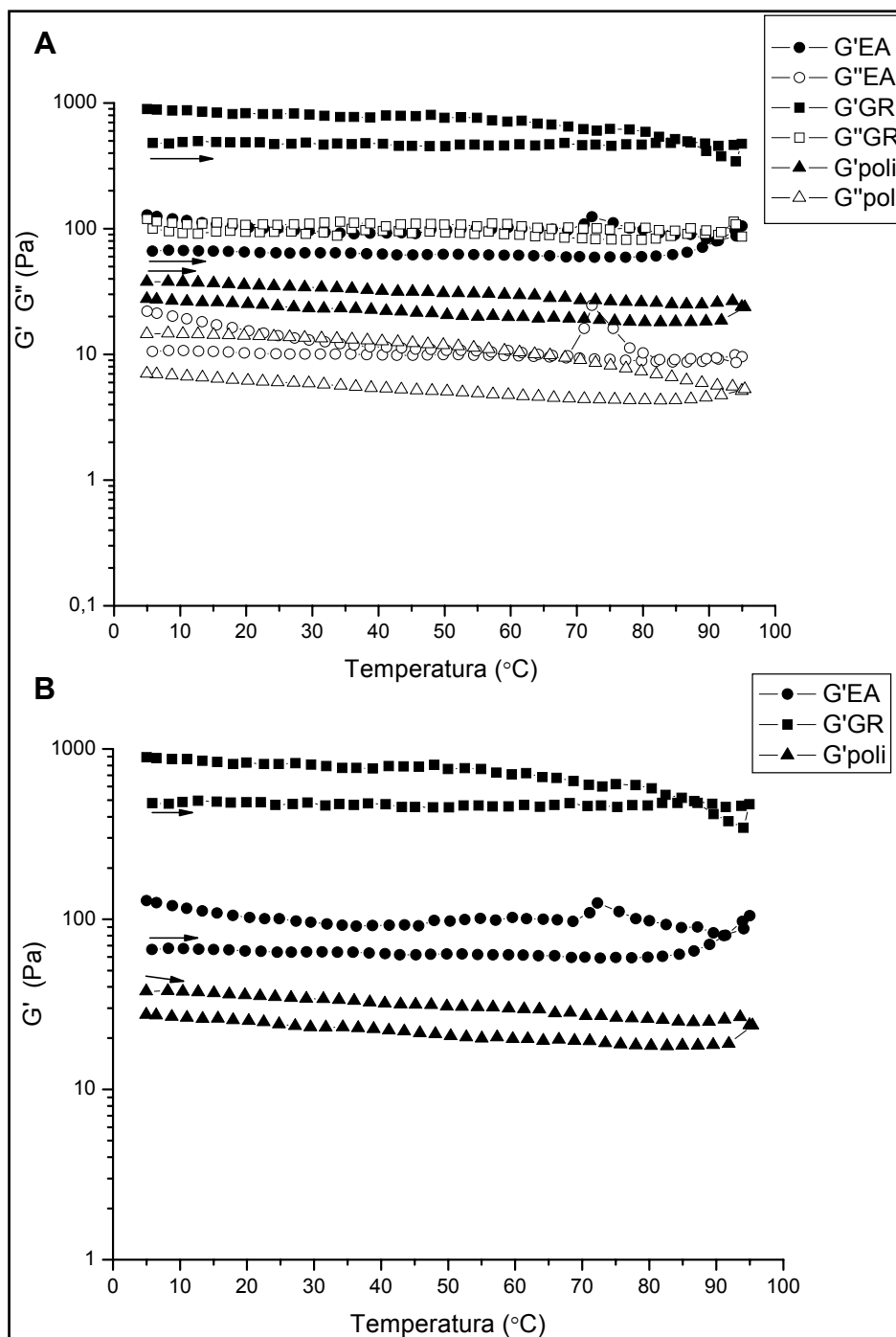


FIGURA 39 - RAMPAS DE TEMPERATURA (5 - 95 $^{\circ}\text{C}$ / 95 - 5 $^{\circ}\text{C}$ – FREQUÊNCIA 1 Hz) DAS FRAÇÕES GR, EA E POLI SOLUBILIZADAS EM ÁGUA NA CONCENTRAÇÃO 4 % (m/v)

Sensor placa-placa PP35Ti e tensão fixa de 0,8 (EA e POLI) e 1 Pa (GR). As setas indicam o início do aquecimento. A: comparação dos valores de G' e G'' ; B: comparação dos valores de G'

O comportamento de EA em diferentes temperaturas também foi analisado utilizando NaCl 0,1M como solvente (Figura 40). Durante o aquecimento, os valores de G' e G'' mantiveram-se praticamente constantes e menores do que aqueles

observados para a fração EA solubilizada em água (Figura 39). Em contrapartida, durante o resfriamento, G' e G'' apresentaram valores significativamente elevados, indicando que, na presença do sal, o aquecimento possibilitou a formação de uma rede de gel mais forte.

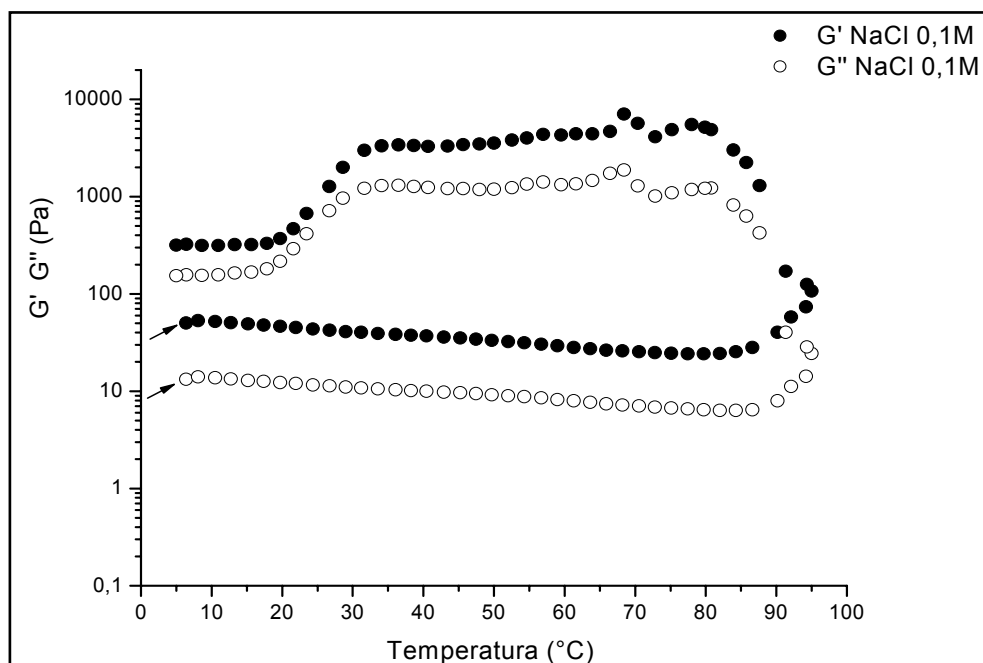


FIGURA 40 - RAMPA DE TEMPERATURA (5 - 95 °C / 95 - 5 °C – FREQUÊNCIA 1 Hz) DA FRAÇÃO EA SOLUBILIZADA EM NaCl 0,1M NA CONCENTRAÇÃO 4 % (m/v)

Sensor placa-placa PP35Ti e tensão fixa de 0,7 Pa. As setas indicam o início do aquecimento

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que a goma do pessegueiro forma soluções de alta viscosidade e géis termoestáveis, apresentando potencial para ser aplicada como espessante e geleificante em diferentes tipos de indústrias. Destaca-se a importância da termoestabilidade do gel formado por EA, uma vez que, vários produtos onde este poderia ser aplicado (alimentícios, por exemplo) precisam ser submetidos a elevadas temperaturas, durante seu processamento e/ou sua aplicação, sem perder sua característica físico-química.

Desta maneira, novas perspectivas se abrem em relação aos pessegueiros, que, futuramente, podem gerar, além dos frutos, um subproduto economicamente importante.

5 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- O polissacarídeo nativo presente na goma exsudada pelo tronco do pessegueiro (PPNA) (M_w $5,61 \times 10^6$ g.mol⁻¹) foi caracterizado como uma arabinogalactana ácida, com cadeia principal composta majoritariamente por ligações do tipo β -(1→6) e altamente substituída por cadeias laterais de arabinose 3-O- e 5-O- substituídas, xilose, ácido glucurônico e seu derivado 4-O-Me, manose e galactose;
- A análise dos oligossacarídeos formados por hidrólise ácida parcial no polissacarídeo nativo (PPNA) indica a presença de ácido glucurônico e 4-Me-glucurônico fazendo parte de terminais não redutores da estrutura, ligados em unidades de galactose e manose;
- O polissacarídeo nativo presente na goma exsudada dos frutos (PPNF) (M_w $6,43 \times 10^6$ g.mol⁻¹), após análises químicas e espectroscópicas, apresentou estrutura altamente similar àquela encontrada para o polissacarídeo da goma do tronco do pessegueiro (PPNA), com poucas diferenças quantitativas;
- Os polissacarídeos das gomas do pessegueiro e da nectarineira apresentam a mesma estrutura, indicando que diferentes variedades de *Prunus persica* produzem gomas altamente semelhantes;
- A polpa do pêssago possui arabinogalactanas do tipo II com estruturas semelhantes àquela encontrada na goma que é exsudada (PPNF), sugerindo que a goma encontra-se pré-formada no fruto antes de ser secretada;
- A goma do pessegueiro forma soluções de alta viscosidade e géis verdadeiros e termoe estáveis em concentrações acima de 3 % (m/v). Estas propriedades reológicas, aliadas a alta produção de pêssagos no sul do Brasil, sugerem um grande potencial de aplicação industrial para esta goma.

REFERÊNCIAS

- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; O'NEILL, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. **Progress in biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, 1996. v. 14. p. 47-55.
- ANDERSON, D. M. W.; HIRST, S. E.; STODDART, J. F. Studies on uronic acid materials. Part. XV. The use of molecular sieve chromatography in studies on *Acacia senegal* gum (Gum arabic). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 2, p.104-114, 1966a.
- ANDERSON, D. M. W.; HIRST, S. E.; STODDART, J. F. Studies on uronic acid materials. Part XXI. Some structural features of *Acacia senegal* gum (Gum arabic). **J. Chem. Soc.**, London, p.1959-1966, 1966b.
- ANDERSON, D. M. W.; GILL, M. C. L. The composition of *Acacia* gum exudates from species of the subseries Juliflorae. **Phytochemistry**, Oxford, v. 14, p. 739-741, 1975.
- ASPINALL, G. O. Gums and mucilages. In: WOLFROM, M. L.; TIPSON, R. S. (eds.), **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**. New York: Academic Press, 1969. v. 24, p. 333-379.
- ASPINALL, G. O. In: **Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1973. p. 95-115.
- ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980. v. 3, p. 473-500.
- ASPINALL, G. O.; BAILLIE, J. Gum Tragacanth. Part II. Arabinogalactan. **J. Chem. Soc.**, London, p. 1714-1721, 1963.
- ASPINALL, G. O.; WHITEHEAD, C. C. Mesquite gum I. The 4-O-methylglucoronogalactan core. **Can J. Chem.**, Ottawa, v. 48, p. 3840-3849, 1970a.
- ASPINALL, G. O.; WHITEHEAD, C. C. Mesquite gum II. The arabinan peripheral chains. **Can J. Chem.**, Ottawa, v. 48, p. 3850-3855, 1970b.

BARBOSA, J. M. Cajueiro. **Galeria de inventores brasileiros**. Janeiro de 2003. Disponível em : <<http://www.inova.unicamp.br/inventabrasil/cajuei.htm>>. Acesso em 08/10/2007.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 1989.

BeMILLER, J. N. **Industrial Gums**. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, John Wiley & Sons, v. 7, 1987.

BELESKI-CARNEIRO, E. B.; GANTER, J. L. M. S; REICHER, F. Structural aspects of the exudate from the fruit of *Chorisia speciosa* St. Hil. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 26, p. 219-224, 1999.

BRITO, A. C. F. de; SIERAKOWSKI, M. R.; REICHER, F.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. de. Dynamic rheological study of *Sterculia striata* and karaya polysaccharides in aqueous solution. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 19, p. 861-867, 2005.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARVALHO, F. Substância extraída do cajueiro é eficaz no tratamento da hipertensão. **Olhar vital**, Rio de Janeiro, edição 075, 12 de abril de 2007. Seção Ciência e Vida. Disponível em: <<http://www.olharvital.ufrj.br>>. Acesso em 10/10/2007.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M. de; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. **J. Nat. Prod.**, Washington, v. 69, p. 1018-1021, 2006.

CIPRIANI, T. R. **Caracterização de polissacarídeos de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) com atividade gastroprotetora**. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 131, p. 209-217, 1984.

DEFAYE, J.; WONG, E. Structural studies of gum arabic, the exudate polysaccharide from *Acacia senegal*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 150, p. 221-231, 1986.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing monosaccharides and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, p. 1-8, 1998.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 320, p. 167-175, 1999.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

DYER, J. R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. In: GLICK, D. (ed.) **Methods of Biochemical Analysis**, New York, 1956. v. 3, p. 111-152.

ELMANAN, M.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Studies on Acacia exudate gums: Part VI. Interfacial rheology of *Acacia senegal* and *Acacia seyal*. **Food Hydrocolloids**, Oxford, *in press*, 2007.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Cultivo do pessegueiro. **Sistemas de produção**, 4. ISSN 1806-9207, versão eletrônica, novembro de 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/CultivodoPessegoiro>>. Acesso em 10/10/2007.

FABIO, J. L. di; DUTTON, G. G. S.; MOYNA, P. The structure of *Chorisia speciosa* gum. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 99, p. 41-50, 1982.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, San Diego, v.197, p.157-162, 1991.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, p. 47-70, 1983.

GAULAO, L. F.; OLIVEIRA, C. M. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. **Trends in Food Science & Technology**, v 19, p. 4-25, 2008.

GOLDSTEIN, I. J.; HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds.). **Methods Carbohydr. Chem.**. New York: Academic Press, 1965. v. 5, p. 361- 369.

GORIN, P. A. J.; HORITSU, K.; SPENCER, J. F. T. An exocellular mannan alternately linked 1,3- β and 1,4- β from *Rhodotorula glutinis*. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 43, p. 950-954, 1965.

GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 128, p. 119-132, 1984.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 53, p. 1212-1224, 1975.

GORIN, P. A. J.; TEIXEIRA, A. Z. A.; TRAVASSOS, L. R.; LABOURIAU, M. L. S.; IACOMINI, M. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magonia pubescens* (Tingui). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 282, p. 325-333, 1996.

GOYCOOLEA, F. M.; MORRIS, E. R.; RICHARDSON, R. K.; BELL, A. E. Solution rheology of mesquite gum in comparison with gum Arabic. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 27, p. 37-45, 1995.

GUTIÉRREZ de G, O.; MARTÍNEZ, M.; SANABRIA, L.; LÉON de PINTO, G.; IGARTUBURU, J. M. 1D- and 2D-NMR spectroscopy studies of the polysaccharide gum from *Spondias purpurea* var. *lutea*. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 19, p. 37-43, 2005.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 48, p. 422-427, 1972.

HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds.). **Methods Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, 1965. v. 5, p. 357- 360.

HIRST, E. L.; JONES, J. K. N. The constitution of damson gum. Part I. Composition of damson gum and structure of an aldobiouronic acid (glycuronosido-2-mannose) derived from it. **J. Chem. Soc.**, London, p. 1174- 1180, 1938.

HIRST, E. L.; JONES, J. K. N. The constitution of damson gum. Part III. Hydrolysis products from methylated damson gum. **J. Chem. Soc.**, London, p. 506-512, 1946.

HIRST, E. L.; JONES, J. K. N. The constitution of egg-plum gum. Part I. **J. Chem. Soc.**, London, p. 1064-1068, 1947.

HIRST, E. L.; JONES, J. K. N. The structure of egg-plum gum. Part II. The hydrolysis products obtained from the methylated degraded gum. **J. Chem. Soc.**, London, p. 120-123, 1948.

IACOMINI, M.; SERRATO, R. V.; SASSAKI, G. L.; LOPES, L.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J. Isolation and partial characterization of a pectic polysaccharide from the fruit pulp of *Spondias cytherea* and its effect on peritoneal macrophage activation. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 76, p. 676-683, 2005.

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Structural and rheological properties from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 31, p. 9-17, 2002.

JONES, J. K. N. The constitution of cherry gum. Part I. Composition. **J. Chem. Soc.**, London, p. 558-563, 1939.

JONES, J. K. N. The structure of peach gum. Part I: The sugars produced on partial hydrolysis of the gum. **J. Chem. Soc.**, London, p. 534-537, 1950.

JONES, J. K. N.; SMITH, F. Plant gums and mucilages. In: PIGMAN, W. W.; WOLFROM, M. L. (eds.). **Adv. Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, v. 4, p. 243-251, 1949.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 36-38, 1965.

JOSELEAU, J. P.; ULLMANN, G. Biochemical evidence for the site of formation of gum arabic in *Acacia senegal*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 29, p. 3401-3405, 1990.

KARDOSOVÁ, A.; ROSÍK, J.; KUBALA, J. Neutral oligosaccharides from the enzyme hydrolysate of the polysaccharide of peach-tree gum (*Prunus persica* (L.) Batsch). **Collection Czechoslovak Chem. Commun.**, Prague, v. 43, p. 3428-3432, 1978.

KARDOSOVÁ, A.; ROSÍK, J.; KUBALA, J.; KOVÁČIK, V. Structure of neutral oligosaccharides from the enzyme hydrolysate of polysaccharide of peach gum (*Prunus persica* (L.) Batsch). **Collection Czechoslovak Chem. Commun.**, Prague, v. 44, p. 2250-2254, 1979.

KOMALAVILAS, P.; MORT, A. J. The acetylation at O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 189, p. 261-272, 1989.

KUBALA, J.; ROSÍK, J. The structures of three neutral oligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis. **Collection Czechoslovak Chem. Commun.**, Prague, v. 42, p. 2809-2814, 1977.

KURZ, C.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Characterisation of cell wall polysaccharide profiles of apricots (*Prunus armeniaca* L.), peaches (*Prunus persica* L.), and pumpkins (*Cucurbita* sp.) for the evaluation of fruit product authenticity. **Food Chem.**, Amsterdam, v. 106, p. 421-430, 2008.

LAPASIN, R.; PRICL, S. Rheology of polysaccharide systems. In: LAPASIN, R.; PRICL, S. (eds.). **Rheology of industrial polysaccharides: Theory and applications**. London: Black Academic & Professional, 1995, p. 251-293.

LAU, J. M.; McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 137, p. 111-125, 1985.

MARQUES, M. R.; XAVIER-FILHO, J. Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, p. 1431- 1433, 1991.

MARTIN, S. **Galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*: Estrutura e Propriedades**. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

MARTÍNEZ, M.; LÉON DE PINTO, G.; SANABRIA, L.; BELTRÁN, O.; IGARTUBURU, J. M.; BAHASAS, A. Structural features of an arabinogalactan gum exudates from *Spondias dulcis* (Anacardiaceae). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 338, p. 619-624, 2003.

MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, p. 715-721, 1998.

MAURER-MENESTRINA, J.; SASSAKI, G. L.; SIMAS, F. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structure of a highly substituted β -xylan from the gum exudate of the palm *Livistona chinensis* (Chinese fan). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 338, p. 1843-1850, 2003.

McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Ann. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 53, p. 625-663, 1984.

MOHAMMADIFAR, M. A.; MUSAVI, S. M.; KIUMARSI, A.; WILLIAMS, P. A. Solution properties of tragacanthin (water-soluble part of gum tragacanth exudates from *Astragalus gossypinus*). **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 38, p. 31-39, 2006.

MONDAL, S. K.; RAY, B.; GHOSAL, P. K.; TELEMAN, A.; VUORINEN, T. Structural features of a water soluble gum polysaccharide from *Murraya paniculata* fruits. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 29, p. 169-174, 2001.

MOORHOUSE, R. Structure / properties relationships of a family of microbial polysaccharides. In: YALPANI, M. (ed.). **Industrial polysaccharides: genetic engineering, structure / properties relations and applications**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 187-206.

MORETÃO, M. P.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 89, p. 175-185, 2003.

MORETÃO, M. P.; ZAMPRONIO, A. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 93, p. 189-197, 2004.

MORRIS, E. R. Polysaccharide rheology and in-mouth perception. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel-Dekker, p. 517-546, 1995.

MOTHÉ, C. G.; RAO, M. A. Rheological behavior of aqueous dispersions of cashew gum and gum arabic: effect of concentration and blending. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 13, p. 501-506, 1999.

NDJOUENKEU, R.; GOYCOOLEA, F. M.; MORRIS, E. R.; AKINGBALA, J. O. Rheology of okra (*Hibiscus esculentus* L.) and dika nut (*Irvingia gabonensis*) polysaccharides. **Carbohydr. Polymers**, Amsterdam, v. 29, p. 263-269, 1996.

OLIVEIRA, C. M. R. de. **Estudo do envoltório externo de sementes de *Magonia pubescens* St. Hil. (Tingui)**. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

OLIVEIRA, J. D.; SILVA, D. A.; PAULA, R. C. M. de; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B. Composition and effect of salt on rheological and gelation properties of *Enterolobium contortisiliquum* gum exudate. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 29, p. 35-44, 2001.

PAULA, R. C. M. de; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 26, p. 177-181, 1995.

PAULA, R. C. M. de; SANTANA, S. A.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of *Albizia lebbek* gum exudate. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 44, p. 133-139, 2001.

PEREIRA-NETTO, A. B.; PETTOLINO, F.; CRUZ-SILVA, C. T. A.; SIMAS, F. F.; BACIC, A.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. dos A.; IACOMINI, M.; MAURER, J. B. B. Cashew-nut tree exudate gum: Identification of an arabinogalactan-protein as a constituent of the gum and use on the stimulation of somatic embryogenesis. **Plant Science**, Amsterdam, v. 173, p. 468-477, 2007.

PERLIN, A. S.; CASU, B. Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-¹³C. **Tetrahedron Letters**, Amsterdam, v. 34, p. 2919-2924, 1969.

PETKOWICZ, C. L. O.; REICHER, F.; MAZEAU, K. Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 37, p. 25-39, 1998.

PINTO, G. L.; MARTINEZ, M.; CORREDOR, A. L.; RIVAS, C.; OCANDO, E. Chemical and ¹³C NMR studies of *Enterolobium cyclocarpum* gum and its degradation products. **Phytochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1311-1315, 1994.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (eds.). **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 205-236.

RENARD, C. M. G. C.; LAHAYE, M.; MUTTER, M.; VORAGEN, F. G. J.; THIBAUT, J. F. Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 305, p. 271-280, 1998.

RIDOUT, M. J.; BROWNSEY, G. J.; MORRIS, V. J. Synergistic interactions of acetan with carob or konjac mannan. **Macromol.**, Washington, v. 31, p. 2539-2544, 1998.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, ano III, n. 1, p. 31- 36, 1993.

ROŠÍK, J.; BRUTENIKOVÁ-SOSKOVÁ, M.; ZITKO, V.; KUBALA, L.; Polysacharid z gummy broskyne *Prunus persica* (L.) Batsch. **Chem. Zvesti**, Bratislava, v. 20, p. 577-585, 1966.

ROŠÍK, J.; KARDOSOVÁ, A.; KUBALA, L. Aldobiuronic acids of the polysaccharides of gums from the trees of genus *Prunus* (I): Methylation analysis. **Chem. Zvesti**, Bratislava, v. 21, p. 739-744, 1967.

SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M. A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.**, v. 37, p. 336-343, 1954.

SANCHEZ, C.; RENARD, D.; ROBERT, P.; SCHMITT, C.; LEFEBVRE, J. Structure and rheological properties of acacia gum dispersions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 16, p. 257-267, 2002.

SANDFORD, P. A.; BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: ASPINAL, G. O. **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983. v. 2, p. 411-490.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 340, p. 731-739, 2005.

SCHINDLER, T. M. **The view of primary cell wall**. Z. Pflanzenernähr. Bodenk., v. 161, p. 499-508, 1998.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos teóricos e práticos**. 2. ed. São Paulo: Artliber Editora Ltda., 2006.

SIMAS, F. F.; GORIN, P. A. J.; GUERRINI, M.; NAGGI, A.; SASSAKI, G. L.; DELGOBO, C. L.; IACOMINI, M. Structure of a heteroxylan of gum exudate of the palm *Scheelea phalerata* (uricuri). **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 2347-2355, 2004.

SIMAS, F. F.; MAURER-MENESTRINA, J.; REIS, R. A.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Structure of the fucose-containing acidic heteroxylan from the gum exudate of *Syagrus romanzoffiana* (Queen palm). **Carbohydr. Polymers**, Amsterdam, v. 63, p. 30-39, 2006.

SIMS, I. M.; FURNEAUX, R. H. Structure of the exudate gum from *Meryta sinclairii*. **Carbohydr. Polymers**, Amsterdam, v. 52, p. 423-431, 2003.

SMITH, F. The constitution of arabic acid. Part II. Degraded arabic acid. **J. Chem. Soc.**, London, p.1724-1738, 1939.

SMITH, F.; MONTGOMERY, R. **The chemistry of plant gums and mucilages**. New York: Reinhold Publishing Corporation, p. 1-13, 1959.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. (ed.). **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983. v. 2, p. 97-180.

STODDART, J. F.; JONES, J. K. N. Some structural features of *Citrus limonia* gum (lemon gum). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 8, p. 29-42, 1968.

TAO, F.; BIAO, G. Z.; YU, J. Z.; NING, Z. H. Isolation and characterization of an acidic polysaccharide from *Mesona blumes* gum. **Carbohydr. Polymers**, Amsterdam, v. 71, p. 159-169, 2008.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, Washington, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of gum arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. **Carbohydr. Polymers**, Amsterdam, v. 47, p. 151-158, 2002.

TISCHER, C. A.; IACOMINI, M.; WAGNER, R.; GORIN, P. A. J. New structural features of the polysaccharide from gum ghatti (*Anogeissus latifolia*). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 337, p. 2205-2210, 2002.

TISCHER, C. A.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Structure of the arabinogalactan from gum tragacanth (*Astragalus gummifer*). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 337, p. 1647-1655, 2002.

TONELI, J. T. C. de L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Rev. Bras. Prod. Agroind.**, v. 7, p. 181-204, 2005.

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S., Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, London, v. 166, p. 444, 1950.

VARNER, J. E.; LIN, L. S. Plant cell wall architecture. **Cell**, Cambridge, v. 56, p. 231-239, 1989.

POSER, G. L. von. Polissacarídeos. Em: SIMÕES, M. O. S. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2º ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade / UFRGS / Ed. da UFSC, p. 417-432, 2000.

WAGNER, R.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; IACOMINI, M.; DELGOBO, C. L.; PIMENTEL, N. M.; GORIN, P. A. J. Structure of the glycoglucuronomannan from *Vochysia lehmanii* (Quaruba). **Carbohydr. Polymers**, Amsterdam, v. 57, p. 269-275, 2004.

WAGNER, R.; SIMAS, F. F.; PEREIRA, G. C. Z.; ANGELI, A.; BRITO, J. O.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; DELGOBO, C. L.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Structure of a glycoglucuronomannan from the gum exudate of *Vochysia tucanorum* (family Vochysiaceae). **Carbohydr. Polymers**, Amsterdam, v. 69, p. 512-521, 2007a.

WAGNER, R.; SIMAS, F.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; SILVA, M. A. da; GORIN, P. A. J. A high-viscosity glycoglucuronomannan from the gum exudate of *Vochysia thyrsoidea*: Comparison with those of other *Vochysia* spp. **Carbohydr. Polymers**, Amsterdam, *in press*, 2007b.

WHISTLER, R. L. Factors influencing gum costs and applications. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. (eds.). **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1973. p. 5-18.

WHISTLER, R. L. Introduction to industrial gums. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. (eds.). **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**. 3th ed. London: Academic Press, 1993. p. 1-20.

WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. Carbon column chromatography. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds.). **Methods Carbohydr. Chem.**. New York: Academic Press, 1962. v. 1, p. 42-44.

WHISTLER, R. L.; DURSO, D. F. Chromatographic separation of sugars on charcoal. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 72, p. 677-679, 1950.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds.). **Methods Carbohydr. Chem.**. New York, 1963(a). v. 2, p. 65-68.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds.). **Methods Carbohydr. Chem.**. New York, 1963(b). v. 2, p. 211-215.

ZHAO, Z.; LI, J.; WU, X.; DAÍ, H.; GAO, X.; LIU, M.; TU, P. Structures and immunological activities of two pectic polysaccharides from the fruits of *Ziziphus jujuba* Mill. cv. jinsixiaozao Hort. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v. 39, p. 917-923, 2006.

APÊNDICE

Comparison of structure of gum exudate polysaccharides from the trunk and fruit of the peach tree (*Prunus persica*)

Fernanda F. Simas^a, Philip A.J. Gorin^a, Ricardo Wagner^a, Guilherme L. Sassaki^a,
Antonio Bonkerner^b, Marcello Iacomini^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, C.P. 19046, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil

^b Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), C.P. 282, CEP 84670-000, Palmas, PR, Brazil

Received 12 February 2007; received in revised form 17 May 2007; accepted 24 May 2007

Available online 2 June 2007

Abstract

The peach tree (*Prunus persica*) produces gum exudates on its trunk and fruit. The former was extracted with water to give polysaccharide (PPN) and residual material was extracted with alkali giving structurally similar PPNA (NMR examination), which was formed in a slightly higher yield (42% compared with 37%). PPNA consisted of Ara, Xyl, Man, Gal, and uronic acids in a 36:7:2:42:13 molar ratio and was homogeneous on HSPEC with M_w $5.61(\pm 0.22) \times 10^6$ g mol⁻¹. Methylation analysis showed mainly nonreducing end- (20%), and 3-*O*- (6%) and 4-*O*-substituted Arap and/or 5-*O*-substituted Araf units (14%) and nonreducing end-units of Xylp (13%). The core Galp units were mainly 3,6-di-*O*- (19%) and 3,4,6-tri-*O*-substituted (14%). The ¹³C NMR spectrum of PPNA confirmed its complexity with 5 C-1 signals from δ 107.5–109.5 from α -L-Araf and a main one at δ 103.2 from the β -D-Galp units. A controlled Smith degradation of PPNA gave 19% polymer (PPNAS), which was almost completely degraded, in a very low yield, to an inner core of PPNAS2 after a second cycle. This contained mainly β -D-Galp units, that were nonreducing end- (25%), 3-*O*- (34%), and 2,3-di-*O*-substituted units (21%), with no evidence of 6-*O*-substitution. Partial hydrolysis of PPNAS with 0.1 M TFA at 100 °C removed Araf units, to give polymeric PPNAS60 (20% yield), which had Gal as its major component (85%). Methylation analysis showed a branched structure mainly nonreducing end- (18%), 3-*O*- (15%), 6-*O*- (45%), and 3,6-di-*O*-substituted Galp units (9%); its ¹³C NMR spectrum had a C-1 main signal at δ 103.8 from β -D-linked units. Under stronger hydrolysis conditions β -D-GlcA-(1 → 6)- α -D-Gal and β -D-GlcA-(1 → 2)- α -D-Man were formed. The fruit gum polysaccharide (PPNF) was homogeneous with M_w $6.43(\pm 0.64) \times 10^6$ g mol⁻¹ and according to ¹³C NMR and HMQC, and TOCSY H-1 correlations, showing few structural differences. These were not apparent on monosaccharide composition and methylation analyses, which only revealed quantitative variations.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Peach tree; *Prunus persica*; Arabinogalactan; Gum exudates; Trunk; Fruit

1. Introduction

The genus *Prunus* belongs from family Rosaceae and includes several fruit-bearing trees including the peach (*P. persica*), damson (*P. insitita*), egg plum (*P. domestica*), cherry (*P. cerasus* and *P. virginiana*), and almond (*P. amygdalus*). These species produce copious gum exudates,

which is caused by a disease (gummosis) on their fruit and trunk, especially after mechanical injury followed by microbial attack. In large peach tree orchards, trunk gummosis commonly occurs, because of enhanced fungal infection due to continuous pruning. The polysaccharide components of these gums belong to the arabinogalactan group (Stephen, 1983) and can be composed of Ara, Xyl, Gal, GlcA, 4-Me-GlcA, with smaller amounts of Rha and Man. Structural variation is based on the proportion of monosaccharides and glycosidic linkages. The first detailed analysis of the polysaccharide isolated from the

* Corresponding author. Tel.: +55 41 3361 1655; fax: +55 41 3266 2042.
E-mail address: iacomini@ufpr.br (M. Iacomini).

trunk gum exudate of *P. persica* was by Jones (1950), who identified its monosaccharide components and GlcpA-(1 → 6)-Gal formed on acid hydrolysis. This β -GlcpA isomer, β -L-Arap-(1 → 3)-L-Ara and β -D-Xylp-(1 → 4)-L-Ara were characterized later (Andrews, Ball, & Jones, 1953; Rosík, Kubala, Kardošová, & Kovácik, 1973).

Further studies were carried out, presumably also on the polysaccharide from the trunk gum exudates. Its structure was investigated using methylation analysis and polarimetry of native and degraded polysaccharide and a β -(1 → 6)-linked Galp main-chain was assigned (Rosík, Bruteničová-Sósková, Zitko, & Kubala, 1966). Partial acid hydrolysis of the polysaccharide gave rise to β -D-GlcpA-(1 → 6)-D-Gal, 4-Me- β -D-GlcpA-(1 → 6)-D-Gal, and β -D-GlcpA-(1 → 2)-D-Man (Rosík, Kardošová, & Kubala, 1967). Examination of neutral oligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis or enzymolysis showed that the structures β -L-Araf-(1 → 3)-L-Araf-(1 →, α -D-Manp-(1 → 3)-D-Galp-(1 →, β -D-Galp-(1 → 6)- β -D-Gal-(1 →, β -L-Arap-(1 → 3)-L-Arap-(1 →, β -D-Galp-(1 → 3)- β -D-Galp-(1 → 6)- β -D-Gal-(1 →, β -D-Galp-(1 → 6)- β -D-Galp-(1 → 6)- β -D-Gal-(1 →, β -D-Galp-(1 → 6)- β -D-Galp-(1 → 3)- β -D-Gal-(1 → 6)- β -D-Gal-(1 →, were present (Kardošová, Rosík, & Kubala, 1978; Kardošová, Rosík, Kubala, & Kovácik, 1979; Kubala & Rosík, 1977; Rosík et al., 1973), which are consistent with (1 → 3)-linked β -D-Galp units in the main-chain. We now study the fine structure of the gum exudate polysaccharide from the trunk of the peach tree using modern techniques, such as GC-MS, ^{13}C NMR and HMQC spectroscopy, and ESI-MS and that from the fruit for comparative purposes.

2. Materials and methods

2.1. Collection of trunk and fruit gum exudates and isolation of their polysaccharides (PPN and PPNF, respectively)

The gum exudates of *P. persica* were collected in Palmas (State of Paraná, Brazil) at the Agronomic Institute of Paraná (IAPAR) (trunk of var. junegold) and from a private property (fruit of var. aerogil). These formed gels in the presence of water at concentrations higher than 3% (w/v), so it was necessary to resort to a dilute solution (1% w/v) for aqueous extraction.

A trunk gum sample (12.0 g) was stirred overnight in H_2O (1.3 L) to give a dispersion containing insoluble fragments, which were removed by passage through a fine cloth. The filtrate was added to excess EtOH ($\times 3$), to give a precipitate (PPN; 37% yield). The retained material was submitted to 1% aq. KOH extraction, in the presence of NaBH_4 at 25 °C, and the extract was neutralized (HOAc) and then added to EtOH ($\times 3$) to give a precipitate (PPNA; 42% yield). PPN and PPNA were each redispersed in H_2O , dialyzed against tap water (24 h), and then freeze-dried. Further ^{13}C NMR examination of these fractions showed that both had an almost identical structure. So, further

characterization studies were carried out only with PPNA because its slightly better yield.

A moist sample of the fruit gum exudate (2.3 g) was submitted to the same method of extraction of trunk gum and yield PPNF (0.20 g) and PPNFA (0.14 g) from aqueous and alkaline extraction, respectively. These two fractions also had the same structure (^{13}C NMR) and further chemical studies were carried out only with the PPNF fraction.

2.2. Controlled Smith degradations of PPNA to give PPNAS and then PPNAS2

PPNA (1.0 g) was dissolved in H_2O (100 mL) and oxidized with 0.1 M NaIO_4 (100 mL) for 72 h in the dark, ethylene glycol (20 mL) then being added. The solution was dialyzed (48 h) and treated with NaBH_4 (to pH 10.0) for 16 h, and then neutralized (HOAc) and dialyzed (48 h). The volume of solution was concentrated to 20 mL and a partial acid hydrolysis of the reduced product at pH 2.0 (TFA), at 100 °C for 40 min was carried out. The resulting solution was adjusted with 1 M NaOH to pH 5.0 and added to excess EtOH (4:1 v/v) to give a precipitate (PPNAS, 189 mg; 19% yield).

PPNA (2.0 g) was also submitted to two successive controlled Smith degradations under the latter conditions to produce fraction PPNAS2 (9 mg; 0.45% yield).

2.3. Partial acid hydrolyses of PPNAS to give PPNAS45 and PPNAS60

PPNAS was partially hydrolyzed with 0.1 M TFA at 100 °C for 45 and 60 min to give PPNAS45 (58% yield) and PPNAS60 (20% yield), respectively. 1 M NaOH was then added to pH 5.0 and PPNAS45 and PPNAS60 were obtained by ethanol precipitation (4:1 v/v).

2.4. Determination of homogeneity and molar mass (M_w)

HPSEC analysis of polysaccharide fractions was carried out using a Waters size exclusion chromatography apparatus. Four columns of Waters Ultrahydrogel 2000/500/250/120 were connected in series and coupled to a multidetection system. Refractive index increments were determined by using a Waters 2410 detector. The value of dn/dc (differential refractive index increment of the solvent–solute solution, with respect to change in solute concentration) was calculated because it is important for the measurement of molecular mass. It was 0.143, 0.135, and 0.141 for PPNA, PPNF, and PPNAS60, respectively. Samples (1.0 mg/mL) were filtered through a 0.22 μm filter (Millipore) and then injected (200 or 100 μL loop). A 0.1 M NaNO_2 solution, containing NaN_3 (0.5 g L^{-1}), was used as solvent.

2.5. Production of acidic oligosaccharides from PPNA

PPNA (2.0 g) in 100 mL of M TFA was kept at 100 °C for 4 h, the solution then evaporated to dryness and the res-

idue dissolved in a small volume of H₂O. This was added to excess EtOH, the resulting precipitate centrifuged off, and the supernatant evaporated to dryness. The residue was applied to Whatman 3MM preparative paper using *n*-BuOH–Pyr–H₂O, 5:3:3 (v/v/v) as eluant and fractions were isolated with R_{Lac} 0.30, 0.78, and 0.96. These were named oligo-0.30 and oligo-0.96, respectively.

2.6. General methods

Polysaccharide fractions were hydrolyzed with 1 M TFA for 8 h at 100 °C to give monosaccharide mixtures. Part of the residue obtained after evaporation was examined using Whatman No. 1 filter paper [solvent: *n*-BuOH–Pyr–H₂O, 5:3:3 (v/v/v)] and the products were detected by the acetone–AgNO₃ dip reagent (Trevelyan, Procter, & Harrison, 1950). The other part of hydrolyzed polysaccharide was reduced with NaBH₄, acetylated with Ac₂O–Pyr (1:1, v/v) for 18 h at 25 °C and the resulting alditol acetates were examined by GC–MS. This was performed with a Varian model 3300 gas chromatograph coupled to a Finnigan Ion-Trap (model 810 R-12) mass spectrometer using a DB-225 capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.) held at 50 °C during injection and then programmed at 40 °C min^{−1} to 220 °C (constant). He was the carrier gas.

The protein and uronic acid content of polysaccharide fractions were determined by the colorimetric methods described by Hartree (1972) and Filisetti-Cozzi and Carpita (1991), respectively. Carboxy-reduction of PPNA to PPNA-CR was carried out by the 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide method (Taylor & Conrad, 1972), NaBH₄ being used as the reducing agent.

2.7. Methylation analysis

Polysaccharide fractions PPNA, PPNAS, PPNAS45, PPNAS60, and PPNAS2 (~10 mg) were methylated according to Ciucanu & Kerek (1984), by dissolution in Me₂SO followed by addition of powdered NaOH and MeI. Each mixture was agitated strongly for 30 min and then left for 18 h. The per-*O*-methylated products were extracted with CHCl₃ from aq. solutions and were hydrolyzed with 50% v/v H₂SO₄ (0.5 mL) at 0 °C for 1 h, followed by dilution to 5.5% v/v. The solution was maintained at 100 °C for 16 h (Saeman, Moore, Mitchell, & Millet, 1954), and successively neutralized (BaCO₃), reduced with NaBD₄, and acetylated as described above to give a mixture of partially *O*-methylated alditol acetates, which were analyzed by GC–MS. These were identified by their typical retention times and electron impact spectra (Sasaki, Gorin, Souza, Czelusniak, & Iacomini, 2005).

2.8. ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy

¹³C NMR, ¹H NMR, ¹H (obs.), ¹³C HMQC, COSY, and TOCSY spectra were obtained using a 400 MHz Bruker model DRX Avance spectrometer equipped with a

5 mm inverse probe. ¹³C NMR (100.6 MHz) analyses were performed at 60 °C in D₂O or Me₂SO-*d*₆ solutions. The ¹H NMR, ¹H (obs.), ¹³C HMQC, COSY, and TOCSY analyses were performed at 60 or 70 °C in D₂O. Chemical shifts of the samples are expressed in PPM (δ) relative to external standard of acetone (δ 30.2) or Me₂SO-*d*₆ (δ 39.5).

3. Results

3.1. Homogeneity, monosaccharide content, methylation analysis, and ¹³C NMR spectra of polysaccharides and structure of acidic oligosaccharides formed on partial hydrolysis

Polysaccharides obtained from the gum exudates of the trunk and fruit of *P. persica* (PPNA and PPNF, respectively) were homogeneous, as determined by HPSEC, and had M_w 5.61(±0.22) × 10⁶ and 6.43(±0.64) × 10⁶ g mol^{−1}, respectively (Fig. 1). They contained <1% protein and were composed of Ara, Xyl, Man, Gal, and uronic acids in a 36:7:2:42:13 and 32:13:2:33:20 molar ratio, respectively (Table 1). The uronic acids in PPNA were characterized by GC–MS of carboxy-reduced polysaccharide (PPNA-CR), which showed the presence of Glc and 4-Me-Glc (2:1 ratio; Table 1), which arose from GlcpA and 4-Me-GlcpA units, respectively.

Methylation–GC–MS analysis of PPNA (Table 2) showed nonreducing end- (20%) and 3-*O*-substituted Araf units (6%), 4-*O*-substituted Arap and/or 5-*O*-substituted Araf units (14%), and nonreducing end-units of Xylp (13%). Galp units were from the highly branched core, with 3,6-di-*O*- (19%) and 3,4,6-tri-*O*-substitutions (14%). Also present were small amounts of 3-*O*- (7%) and 6-*O*- (1%), 2,3-di-*O*- (2%), and 3,4-di-*O*-substituted Galp units (4%). The methylation data for PPNF (Table 2) showed a higher proportion of 3,6-di-*O*- (26%) and a lower one of 3,4,6-tri-*O*-substituted Galp units (6%), when compared with PPNA. As with the monosaccharide compositions, it showed indistinguishable structures for the trunk and fruit gum polysaccharides, but in different proportions.

The ¹³C NMR spectrum of PPNA (Fig. 2a) contained at least 10 signals in the anomeric region, in accord with the complex structure. The signals at δ 107.5–109.8 were from α-L-Araf units (Joseleau, Chambat, Vignon, & Barnoud, 1977). The main signal at δ 103.2 can be assigned to C-1 of β-D-Galp units (Tischer, Gorin, & Iacomini, 2002).

Comparison of the ¹³C NMR spectrum of PPNA (Fig. 2a) with that PPNF (Fig. 2b) showed only very minor differences. This was also true of HMQC (Fig. 3a, b) and TOCSY examination (Fig. 4a, b), thus agreeing with the small quantitative differences in monosaccharide composition and methylation data.

The complex HMQC spectra of PPNA and PPNF (Fig. 3a, b) contained a group of 4 α-L-Araf C-1 signals, which were at high frequency of δ 107.2–109.2. Although β-D-Xylp, β-D-Galp, and β-GlcpA units were components of PPNA, according to the literature, only one representa-

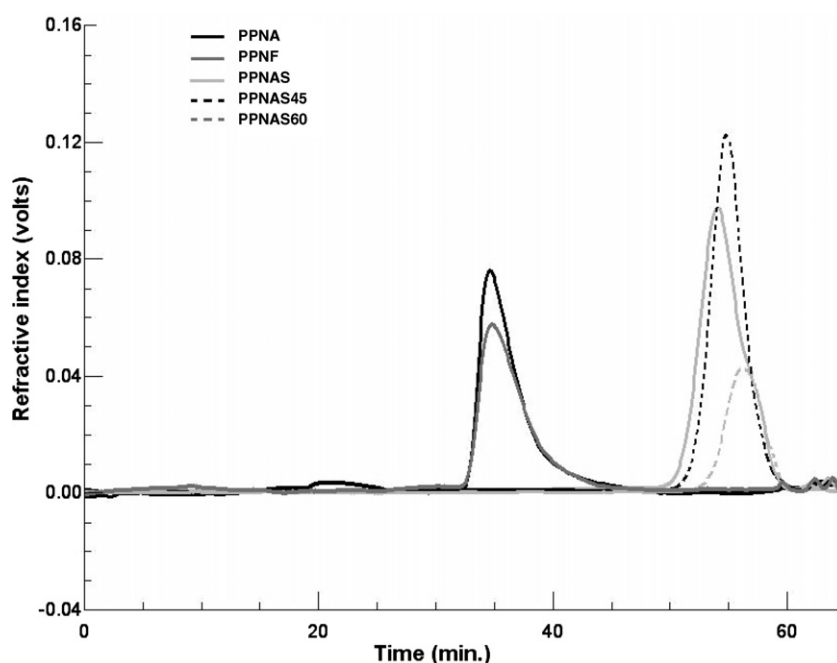


Fig. 1. Elution profiles of PPNA, PPNF, PPNAS, PPNAS45, and PPNAS60 using HPSEC, obtained with a refractive index detector.

Table 1

Monosaccharide composition of polysaccharides PPNA, PPNF, PPNA-CR, PPNAS, PPNAS45, PPNAS60, and PPNS2

Polysaccharide fraction	Monosaccharide composition (%) ^a						
	Ara	Xyl	Man	4-Me-Glc	Gal	Glc	Uronic acids ^b
PPNA	36	7	2	–	42	–	13
PPNF	32	13	2	–	33	–	20
PPNA-CR	38	8	3	2	45	4	8
PPNAS	19	–	9	–	70	–	2
PPNAS45	13	–	10	–	75	–	2
PPNAS60	–	–	12	–	85	–	3
PPNS2	–	–	29	–	71	–	–

^a Analyzed on a DB-225 column by GC–MS after total hydrolysis, reduction, and acetylation.

^b Determined by the colorimetric method of Filisetti-Cozzi and Carpita (1991).

Table 2

Partially *O*-methylalditol acetates formed on methylation analysis of polysaccharide fractions

Partially <i>O</i> -methylated alditol acetates	Parent linkage	<i>R</i> _t ^a	Polysaccharide fraction (%)					
			PPNA	PPNF	PPNAS	PPNAS45	PPNAS60	PPNS2
2,3,5-Me ₃ -Ara	Araf-(1→	7:42	20	16	10	5	—	—
2,3,4-Me ₂ -Xyl	Xylp-(1→	8:07	13	16	—	—	—	—
2,5-Me ₂ -Ara	→3)-Araf-(1→	8:57	6	3	—	—	—	—
2,3-Me ₂ -Ara	→5)-Araf-(1→, →4)-Arap-(1→	9:26	14	12	—	—	—	—
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Galp-(1→	9:31	—	3	10	11	18	25
2,4,6-Me ₃ -Man	→3)-Manp-(1→	11:04	—	—	5	4	7	17
2,4,6-Me ₃ -Gal	→3)-Galp-(1→	11:21	7	7	16	17	15	34
2,3,4-Me ₃ -Gal	→6)-Galp-(1→	12:46	1	4	31	34	45	—
4,6-Me ₂ -Gal	→2,3)-Galp-(1→	12:58	2	4	5	8	6	21
2,6-Me ₂ -Gal	→3,4)-Galp-(1→	13:19	4	3	—	—	—	—
2,4-Me ₂ -Gal	→3,6)-Galp-(1→	16:27	19	26	23	20	9	3
2-Me-Gal	→3,4,6)-Galp-(1→	18:29	14	6	—	—	—	—

^a Retention times (s) obtained with a DB-225 column at 215 °C.

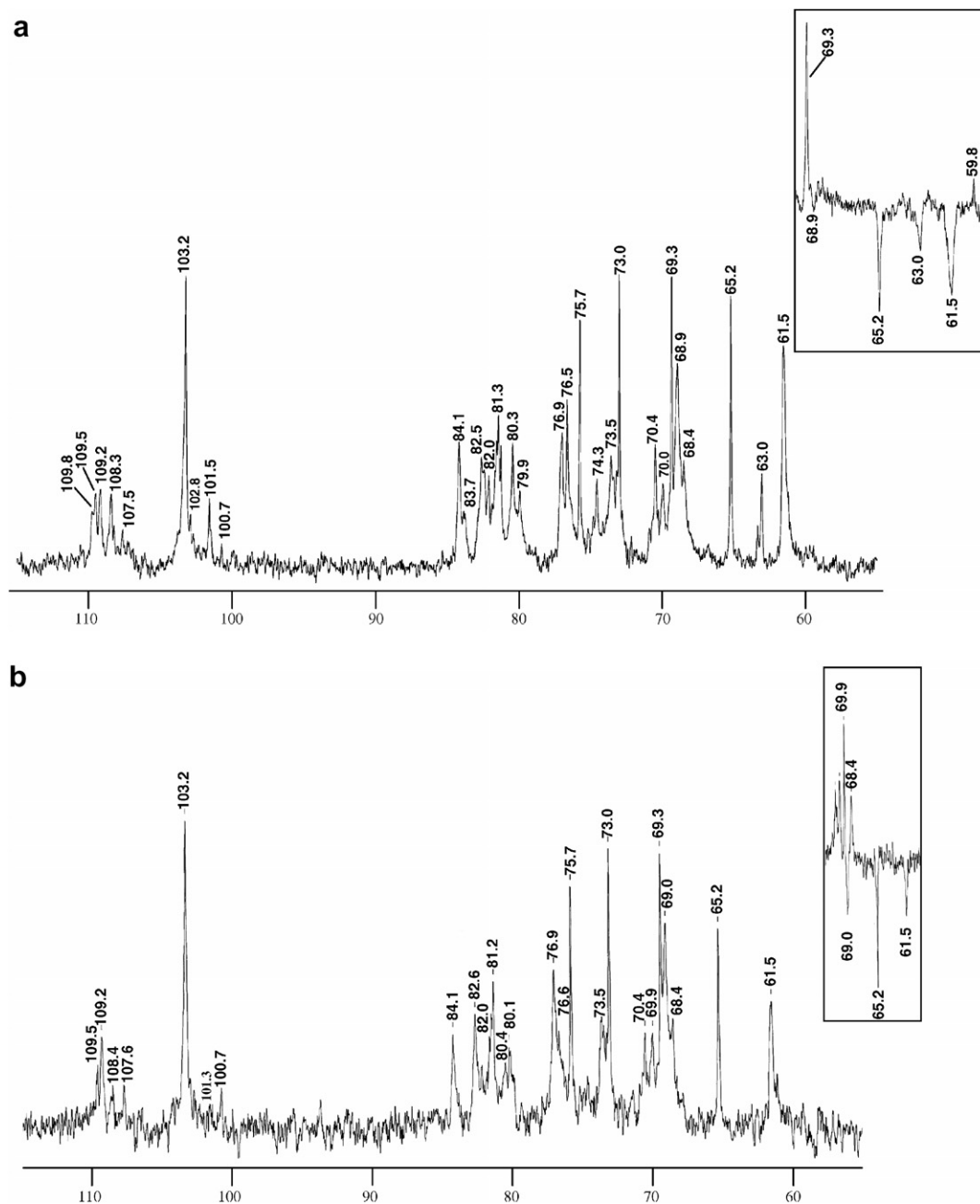


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of PPNA (a) and PPNF (b) from trunk and fruit gum exudates, respectively. Solvent: D_2O at 60°C with numerical values in δ (PPM). Inserts: inverted signals in a ^{13}C NMR-DEPT spectra.

tive C-1 signal at high (δ 103.2) and low H-1 frequencies (δ 4.476) was present. The β -D-pyranosyl configuration was confirmed by a coupled HMQC spectrum of PPNA (Fig. 5) which contained a typical signal with $J_{\text{C-1/H-1}} = 161$ Hz (Perlin & Casu, 1969). Three other signals were from δ 99.9 to 101.5 (Fig. 3a, b) with $J_{\text{C-1/H-1}} = 173$ –181 Hz, which could be from α -D-Manp and β -L-Arap units.

As HMQC often gives signals that are not quantitative and sometimes absent, fractions of acidic oligosaccharides were obtained following partial hydrolysis of PPNA. These had R_{Lac} 0.30 and 0.96 and were named oligo-0.30 and

oligo-0.96, respectively. Oligo-0.96 gave a ^{13}C NMR spectrum (Fig. 6a) identical with that of β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp (Wagner et al., 2004). Its HMQC spectrum (not shown) contained main anomeric signals at δ 101.7/4.57 (N-1') and 92.2/5.37 (N_α -1). Oligo-0.30 was mainly β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- α -D-Galp, according to its ^{13}C NMR spectrum (Fig. 6b) (Delgobo, Gorin, Jones, & Iacomini, 1998): its DEPT spectrum had an inverted CH_2 -6 arising from 6-O-substitution. The HMQC spectrum of oligo-0.30 (not shown) contained main anomeric signals at δ 102.9/4.53 (N-1'), 96.9/4.63 (N_β -1), and 92.8/5.31 (N_α -1). ESI-MS (negative mode) (not shown) gave a corresponding

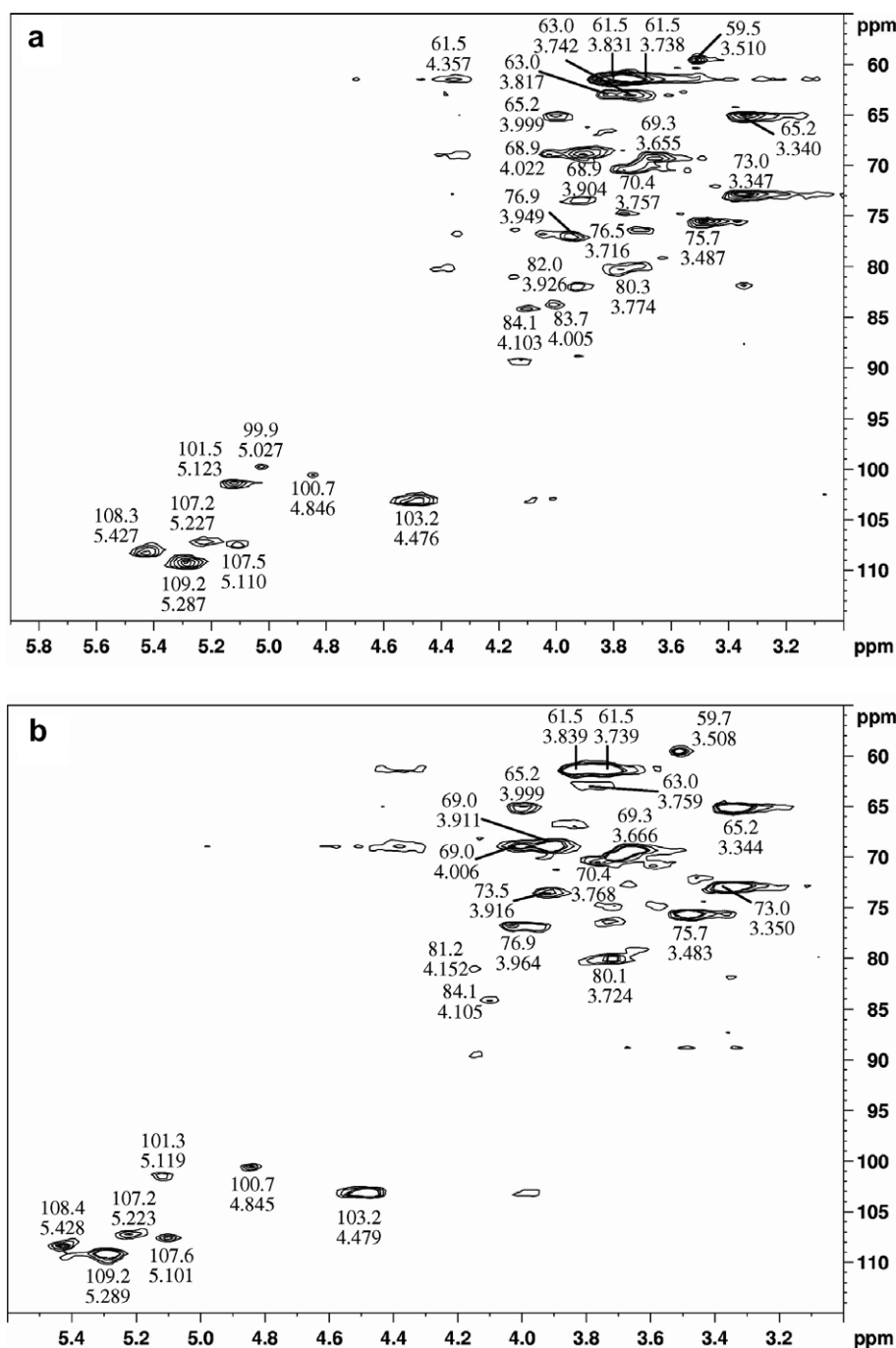


Fig. 3. HMQC spectra of PPNA (a) and PPNF (b), obtained from trunk and fruit gum exudates, respectively. Solvent: D₂O at 70 °C with numerical values in δ (PPM).

molecular ion at m/z 355 with a much smaller one of its 4Me-GlcpA derivative at m/z 369.

3.2. Successive, controlled Smith degradations of PPNA

A controlled Smith degradation of PPNA produced a polysaccharide (PPNAS; 19% yield) that was homogeneous when analyzed by HPSEC (Fig. 1) and was composed of Ara, Man, Gal, and uronic acids in a 19:9:70:2 molar ratio (Table 1). Methylation data (Table 2) showed that remain-

ing Araf units were present only as nonreducing end-units (10%) with nonreducing end- (10%), 3-*O*- (16%), 6-*O*- (31%), 2,3-di-*O*- (5%), and 3,6-di-*O*-substituted Galp units (23%), showing a still complex structure. The ¹³C NMR spectrum of PPNAS (Fig. 7a) was less complex than that of PPNA, with four signals in the anomeric region. The signal at δ 109.2 belongs to nonreducing end-units of residual α -L-Araf units, which survived the degradation, and which were 3-*O*-substituted. The signals at δ 104.4 and 103.7 were assigned to nonreducing end-units and 3-*O*- and/or 6-*O*-

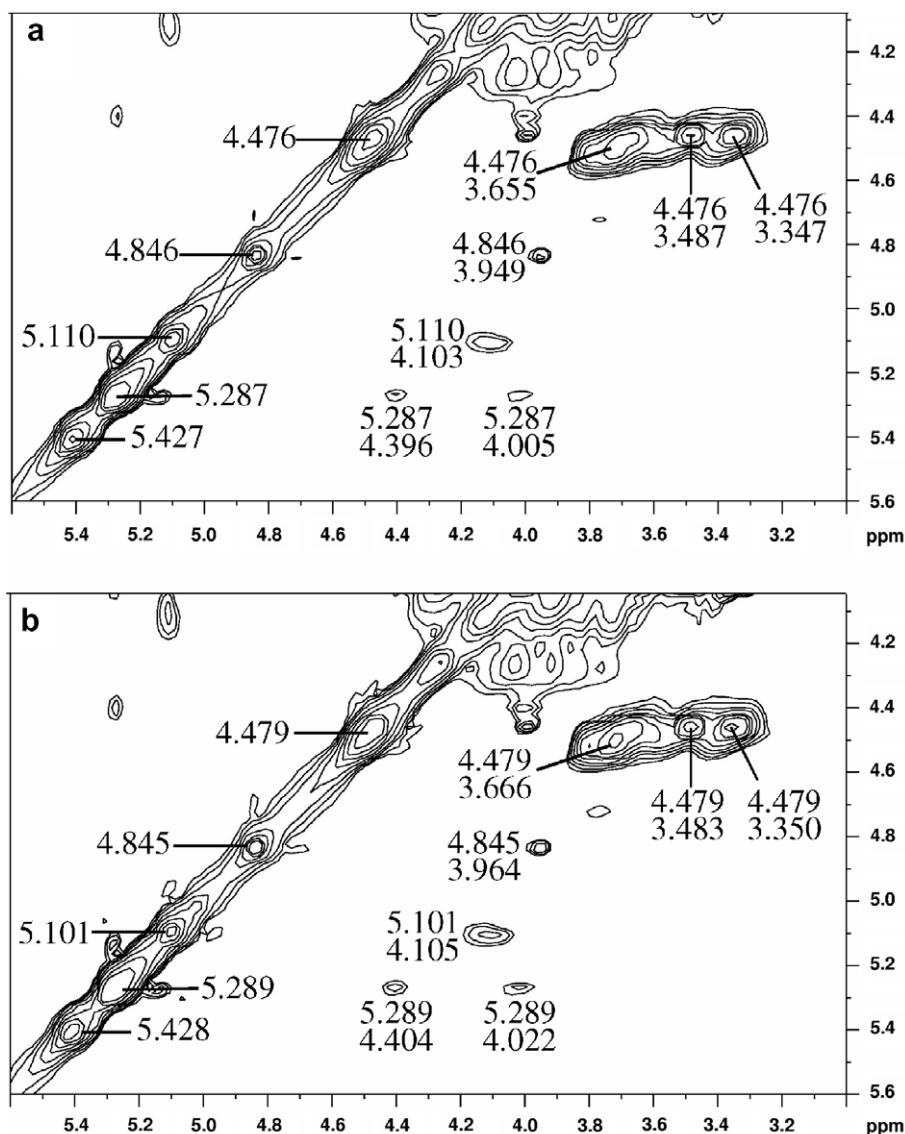


Fig. 4. H-1 correlations in TOCSY spectra of PPNA (a) and PPNF (b) from trunk and fruit gum exudates, respectively. Solvent: D₂O at 70 °C with numerical values in δ (PPM).

substituted β -D-Galp units (Gorin & Mazurek, 1975; Tischer et al., 2002). The smaller signal at δ 100.8 could be from 3-*O*-substituted α -D-Manp units (Wagner et al., 2004). At lower frequency there were signals at δ 68.1, 61.8, 60.7, and 60.5, inverted in a ¹³C NMR DEPT spectrum (Fig. 7a, insert), characterizing 6-*O*-substituted β -D-Galp core units, C-5 of α -L-Araf units, and free C-6 of β -D-Galp and α -D-Manp units, respectively (Delgobo, Gorin, Tischer, & Iacomini, 1999; Sims & Furneaux, 2003; Tischer et al., 2002).

A second successive controlled Smith degradation on PPNA gave polymeric PPNAS2 in a 0.45% overall yield, low since PPNAS contained many free *vic*-hydroxyl groups, by virtue of the (1 → 6)-linked Galp units. It was composed of Gal and Man in a 71:29 molar ratio (Table 1). Methylation analysis (Table 2) suggested a core component of 3-*O*-substituted Galp units (34%) with some of

these being substituted at O-2 (21%) by side chains of 3-*O*-substituted Manp (17%) and at O-6 (3%) by nonreducing end-units of Galp (25%). These data indicated the presence of chains of Manp (1 → 3)-linked to Galp units and suggested that this type of linkage does not alternate with (1 → 6)-linkage at main-chain Galp units. The anomeric region of the ¹³C NMR spectrum of PPNAS2 (Fig. 8) had signals at δ 104.5–104.8 and 103.7 from nonreducing end-units and 3-*O*-substituted β -D-Galp units respectively (Delgobo et al., 1999; Gorin & Mazurek, 1975) and at δ 99.2–100.6 from α -D-Manp units (Wagner et al., 2004).

3.3. Partial acid hydrolyses of Smith degraded PPNAS

In order to investigate further the core structure of PPNA, a partial acid hydrolysis of the Smith degraded product (PPNAS) was carried out with 0.1 M TFA at

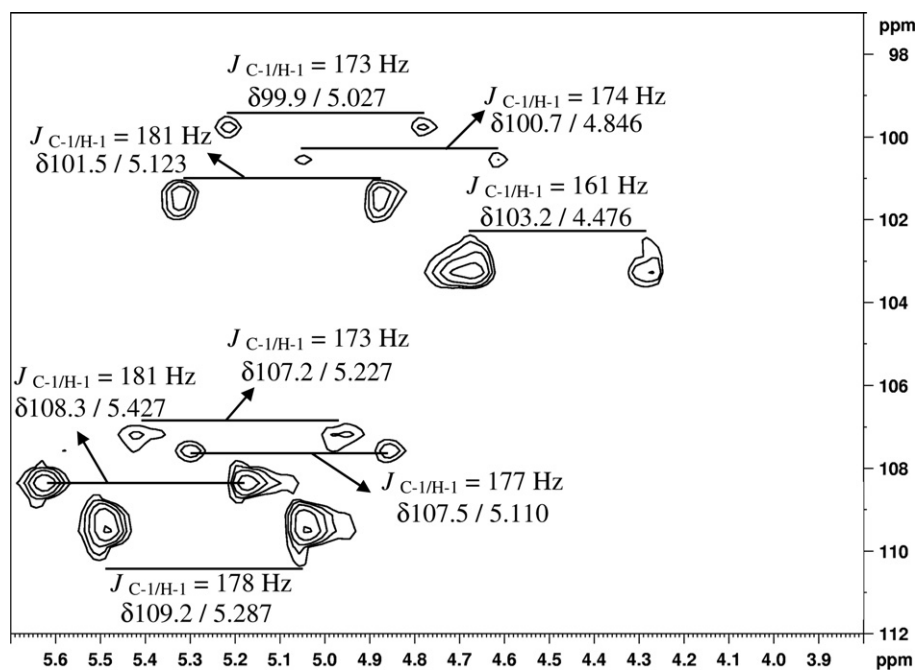


Fig. 5. $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ coupled HMQC spectrum of anomeric region of PPNA in D_2O , at 70°C .

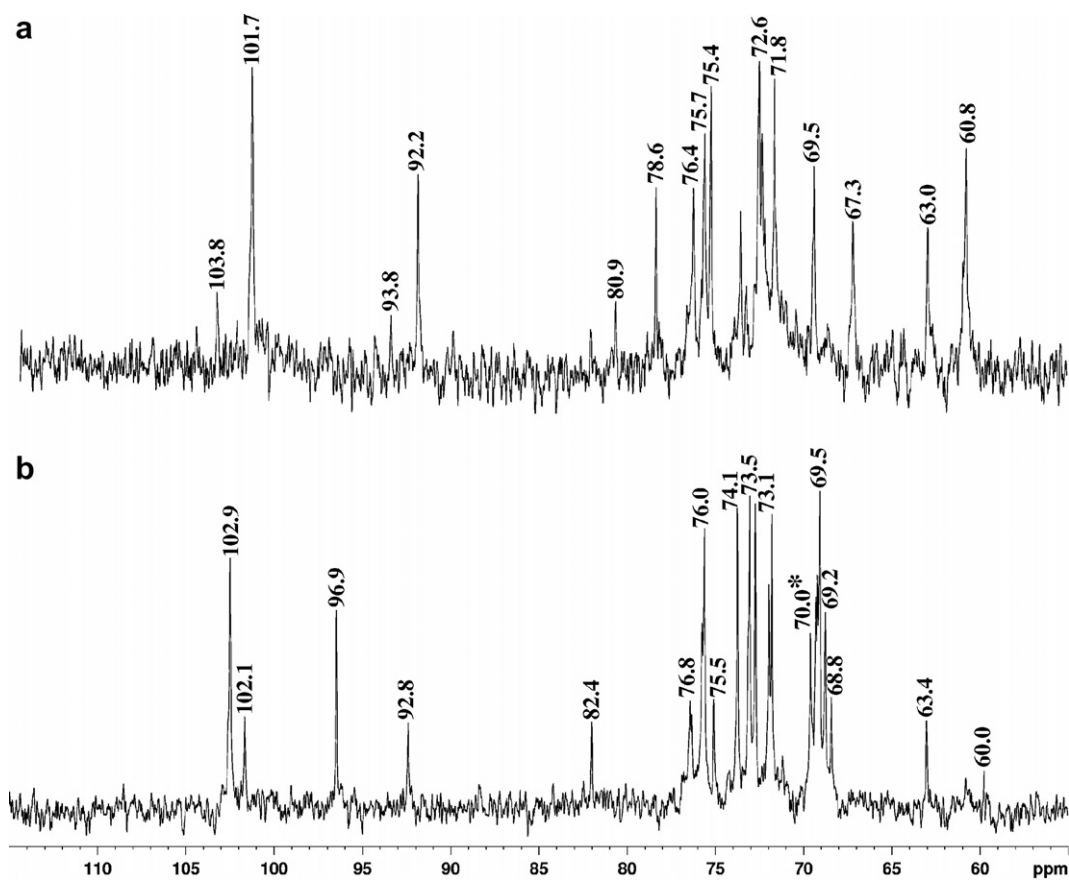


Fig. 6. ^{13}C NMR of aldobiouronic acids oligo-0.96 (a) and oligo-0.30 (b). Solvent: D_2O at 60°C with numerical values in δ (PPM). *Signal from 6-*O*-substitution that inverted on DEPT- ^{13}C NMR.

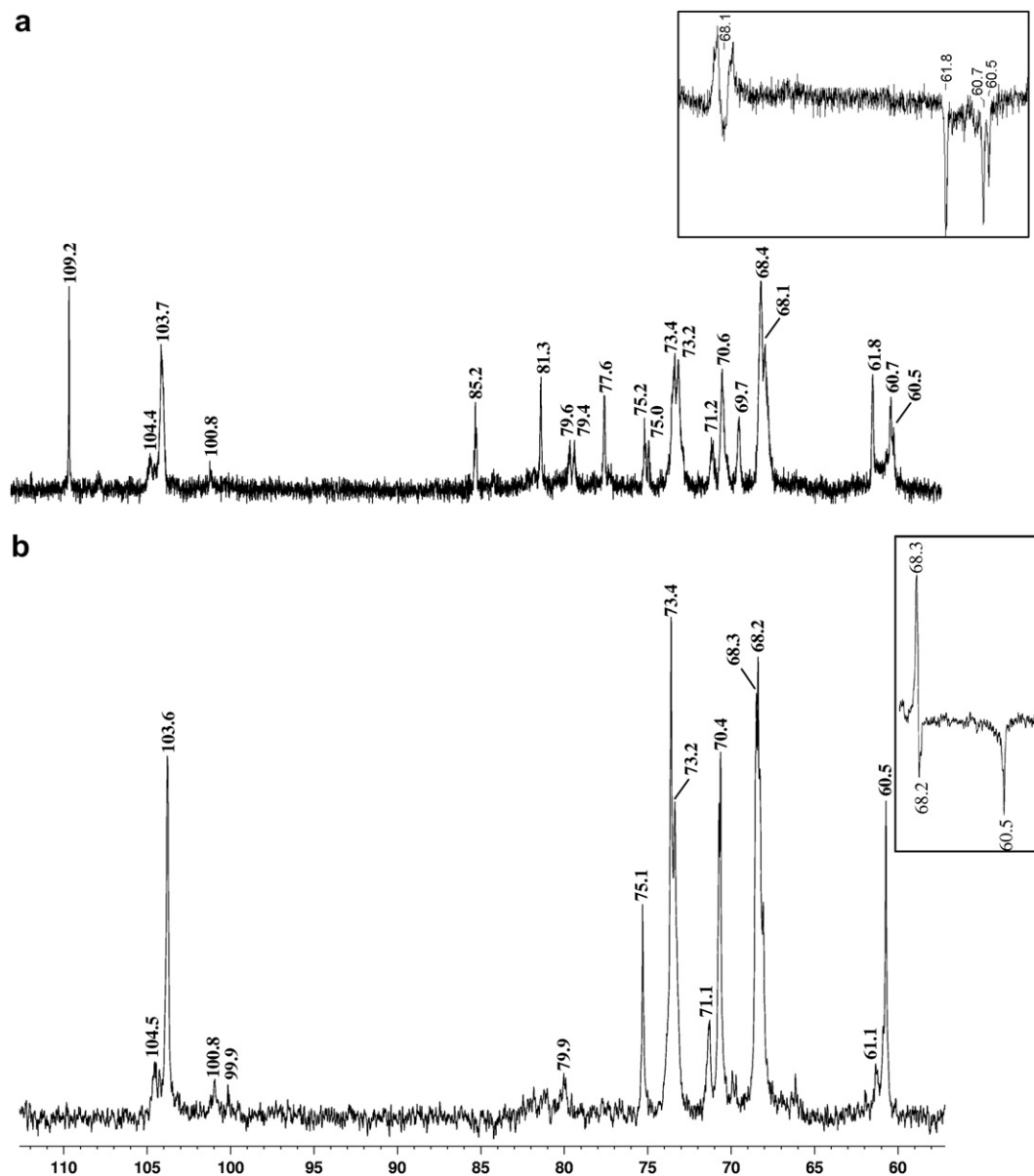


Fig. 7. ^{13}C NMR spectra of PPNAS (a) and PPNAS60 (b). Solvent: $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ at 60°C with numerical values in δ (PPM). Inserts: inverted signals on DEPT ^{13}C NMR.

100°C for 45 and 60 min, to yield PPNAS45 (58% yield) and PPNAS60 (20% yield), respectively.

PPNAS45 was homogeneous on HPSEC (Fig. 1) and was composed of Ara, Man, Gal, and uronic acids in a 13:10:75:2 molar ratio (Table 1). Methylation data (Table 2) showed that the 45 min hydrolysis was not sufficient to remove residual Araf units, which appeared as nonreducing end-units (5%) in PPNAS45, the other derivatives being the same as those encountered in PPNAS. PPNAS60 was also homogeneous HPSEC (Fig. 1) and had M_w $1.26(\pm 0.19) \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$. It was composed of Man, Gal, and uronic acids in a 12:85:3 molar ratio (Table 1) and methylation data showed a marked decrease of 3,6-di-*O*-substituted (9%) with a concomitant increase of 6-*O*-substituted Galp units (45%) (Table 2), which showed that the core contained a high proportion of the latter structure.

The ^{13}C NMR spectrum of PPNAS45 (not shown) contained the same signals as PPNAS, although that of α -L-Araf units at δ 109.2 was less intense. On the other hand, the ^{13}C NMR spectrum of PPNAS60 (Fig. 7b) had one main C-1 signal at δ 103.6 from the mono- and di-*O*-substituted β -D-Galp units. The other signals at δ 104.5 and 100.8 can perhaps be assigned to nonreducing end-units of β -D-Galp (Tischer et al., 2002) and to α -D-Manp units, respectively (Wagner et al., 2004). Those at δ 68.2 and 60.5, which were inverted in a ^{13}C NMR DEPT spectrum (Fig. 7b, insert) were from *O*-substituted and non-substituted C-6 of β -D-Galp units, respectively. At higher frequency, the signals at δ 75.1, 73.4, 70.4, 68.3 were from C-5, C-3, C-2, and C-4, respectively, of β -D-Galp core units (Gorin & Mazurek, 1975).

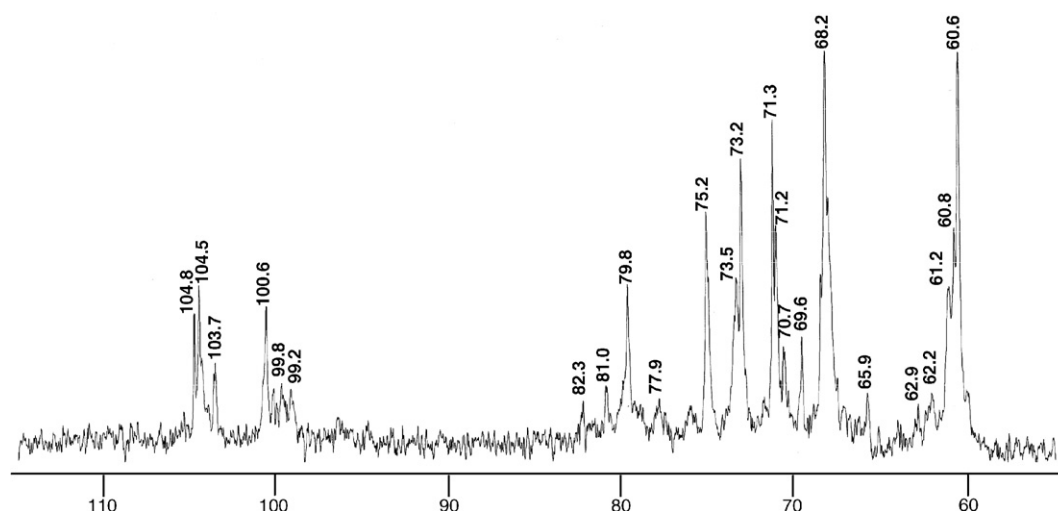


Fig. 8. ^{13}C NMR spectrum of PPNS2 obtained after two successive controlled Smith degradations of PPNA. Solvent: $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ at 60°C with numerical values in δ (PPM).

4. Conclusions

NMR and ESI-MS analytical techniques have now been employed, in addition to those previously used to study the structure of the polysaccharides of *P. persica* gum exudates. Previous studies, starting with methylation analyses by Rosík et al. (1966), led to a proposal that the acidic arabinogalactan had a (1 \rightarrow 6)-linked Galp main-chain. Partial acid hydrolysis of the polysaccharide had given rise to β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)-D-Gal, 4-Me- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)-D-Gal, β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)-D-Man (Rosík et al., 1967), β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara, β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-L-Ara (Andrews et al., 1953; Rosík et al., 1973), and [β -Galp-(1 \rightarrow 6)]₁₋₂-Gal (Kubala & Rosík, 1977), while enzymolysis furnished β -Galp-(1 \rightarrow 6)-Gal, β -Galp-(1 \rightarrow 3)- β -Galp-(1 \rightarrow 6)-Gal (Kardošová et al., 1978), and β -Galp-(1 \rightarrow 6)- β -Galp-(1 \rightarrow 3)- β -Galp-(1 \rightarrow 6)-Gal (Kardošová et al., 1979). However, none of these fragments contained more than two successive (1 \rightarrow 6)-linkages, so that the main-chain structure is still in doubt.

We now find PPNA to be homogeneous and to contain Ara, Xyl, Man, Gal, and uronic acids in a 36:7:2:42:13 ratio, with a \sim 2:1 ratio between GlcA and its 4-*O*-methyl derivative. Its main components were nonreducing end-units of β -D-Xylp and α -L-Araf, 2-*O*-, 4-*O*-substituted Arap and/or 5-*O*-substituted Araf units, and 3,6-di- and 3,4,6-tri-*O*-substituted β -D-Galp units. Attempts to show a uniform main-chain structure were only partially successful, the most predominant link being 45% of (1 \rightarrow 6)-links after one controlled Smith degradation, the second serving to almost completely open the structure, although an inner core was formed in very low yield. This contained mainly β -D-Galp units, which were nonreducing end- (25%), 3-*O*- (34%), and 2,3-di-*O*-substituted units (21%) with only 3% of 3,6-di-*O*-substituted units, unlike an exclusive (1 \rightarrow 6)-linked main-chain (Rosík et al., 1966). PPNA could thus have a core with mixed (1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 6)-linked Galp units, although this remains to be clarified.

Such a structure, however, contrasts with those of another acidic arabinogalactan group (Stephen, 1983) comprising gums of *Acacia* spp. One example is that of *Acacia senegal*, which although containing (1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 6)-linked β -Galp units, survived seven successive degradations with its 3-*O*- and 3,6-di-*O*-substituted β -Galp units to form polymers with predominant (1 \rightarrow 3)-linkages (Anderson, Hirst, & Stoddart, 1966).

The structure of the fruit gum polysaccharide (PPNF) was investigated in less detail, but could be compared with that of with PPNA. A reason for possible differences could be seasonal variation (Stephen, 1983), not the case here, although we obtained our gums from different varieties of *P. persica* growing in proximity. PPNF was homogeneous with some differences from PPNA in its monosaccharide ratios (Table 1), containing more Xyl and uronic acid, and less Gal. Methylation analysis showed PPNF to be less branched, with more 3,6-di-*O*- and less 3,4,6-tri-*O*-substituted Galp units, although component structures were qualitatively similar (Table 2). This was also reflected in the close similarity of their ^{13}C NMR (Fig. 2a, b), HMQC (Fig. 3a, b), and TOCSY correlation spectra, starting from H-1 (Fig. 4a, b).

References

- Anderson, D. M. W., Hirst, E. L., & Stoddart, J. F. (1966). Studies of uronic acid materials. Part XVII. Some structural features of *Acacia senegal* (gum Arabic). *Journal of the Chemical Society*, 1959–1966.
- Andrews, P., Ball, D. H., & Jones, J. K. N. (1953). The isolation of oligosaccharides from gums and mucilages. Part I. *Journal of the Chemical Society*, 4090–4095.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209–217.
- Delgobo, C. L., Gorin, P. A. J., Jones, C., & Iacomini, M. (1998). Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. *Phytochemistry*, 47, 1207–1214.
- Delgobo, C. L., Gorin, P. A. J., Tischer, C. A., & Iacomini, M. (1999). The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera*

- colubrina*) gum exudate: An aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. *Carbohydrate Research*, 320, 167–175.
- Filisetti-Cozzi, T. M. C. C., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157–162.
- Gorin, P. A. J., & Mazurek, M. (1975). Further studies on assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Canadian Journal of Chemistry*, 53, 1212–1224.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48, 422–427.
- Jones, J. K. N. (1950). The structure of peach gum. Part I. The sugars produced on partial hydrolysis of the gum. *Journal of the Chemical Society*, 534–537.
- Joseleau, J. P., Chambat, G., Vignon, M., & Barnoud, F. (1977). Chemical and ^{13}C NMR studies on two arabinans from the inner bark of *Rosa glauca*. *Carbohydrate Research*, 58, 165–175.
- Kardošová, A., Rosík, J., & Kubala, J. (1978). Neutral oligosaccharides from the enzyme hydrolysate of the polysaccharide of peach-tree gum (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 43, 3428–3432.
- Kardošová, A., Rosík, J., Kubala, J., & Kovácik, V. (1979). Structure of neutral oligosaccharides from the enzyme hydrolysate of polysaccharide of peach gum (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 44, 2250–2254.
- Kubala, J., & Rosík, J. (1977). The structures of three neutral oligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 42, 2809–2814.
- Perlin, A. S., & Casu, B. (1969). Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-1- ^{13}C . *Tetrahedron Letters*, 34, 2919–2924.
- Rosík, J., Bruteničová-Sósková, M., Zitko, V., & Kubala, L. (1966). Polysaccharide from the resin of the peach tree *Prunus persica* (L.) Batsch. *Chemicke Zvesti*, 20, 577–585.
- Rosík, J., Kardošová, A., & Kubala, J. (1967). Aldobiuronic acids of the polysaccharides of gums from the trees of genus *Prunus* (I): Methylation analysis. *Chemicke Zvesti*, 21, 739–744.
- Rosík, J., Kubala, J., Kardošová, A., & Kovácik, V. (1973). Isolation and identification of 4-O- β -D-xylopyranosyl-L-arabinopyranose from the peach gum polysaccharide. I. *Chemicke Zvesti*, 27, 688–691.
- Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L., & Millet, M. A. (1954). Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, 37, 336–343.
- Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Souza, L. M., Czelusniak, P. A., & Iacomini, M. (2005). Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC–MS: Some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*, 340, 731–739.
- Sims, I. M., & Furneaux, R. H. (2003). Structure of the exudate gum from *Meryta sinclairii*. *Carbohydrate Polymers*, 52, 423–431.
- Stephen, A. M. (1983). Other plant polysaccharides. In G. O. Aspinall (Ed.), *The polysaccharides* (Vol. 2, pp. 97–180). New York, NY: Academic Press.
- Taylor, R. L., & Conrad, H. E. (1972). Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry*, 11, 1383–1388.
- Tischer, C. A., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2002). The free reducing oligosaccharides of gum arabic: Aids for structural assignments in the polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 47, 151–158.
- Trevelyan, W. E., Procter, D. P., & Harrison, J. S. (1950). Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, 166, 444.
- Wagner, R., Woranovicz-Barreira, S. M., Iacomini, M., Delgobo, C. L., Pimentel, N. M., & Gorin, P. A. J. (2004). Structure of the glycolglucuronomannan from *Vochysia lehmannii* (Quaruba). *Carbohydrate Polymers*, 57, 269–275.